

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von CpG-A- und
CpG-C-Oligodesoxynukleotiden als Grundlage für die
Entwicklung immunstimulatorischer Nanopartikel**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christine Richter

aus Haan

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Mitberichtersteller: Prof. Dr. rer. nat. Th. Brocker
Prof. Dr. rer. nat. P. B. Becker

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. I. Bekeredjian-Ding
Dr. rer. biol. hum. R. Besch

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2006

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das humane Immunsystem	1
1.1.1	Die angeborene und die adaptive Immunität.....	1
1.1.2	<i>Toll-like</i> Rezeptoren - Erkennungssysteme der angeborenen Immunität.....	3
1.1.3	Typ-I Interferon - ein Effektor der angeborenen Immunität	6
1.1.4	Dendritische Zellen - Mittler zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität.....	7
1.1.5	B-Zellen - Effektorzellen der adaptiven Immunität.....	9
1.2	CpG-Oligodesoxynukleotide	11
1.2.1	Geschichtlicher Hintergrund: Von bakteriellen Lysaten zu synthetischer CpG-DNA	11
1.2.2	Wirkung und Wirkmechanismen von CpG-DNA.....	13
1.2.3	Definition von drei Klassen synthetischer CpG-ODN: CpG-A, CpG-B und CpG-C	15
1.2.4	Therapeutischer Einsatz von CpG-Oligodesoxynukleotiden	16
1.3	Ziele dieser Arbeit	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Geräte, Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.1	Geräte.....	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3	Chemikalien.....	22
2.1.4	Reagenziensätze.....	23
2.1.5	Materialien für die Zellkultur	23
2.1.6	Zytokine	23
2.1.7	Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....	24
2.1.7.1	Medien und Puffer für die Zellkultur.....	24
2.1.7.2	Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese	24
2.1.8	Antikörper für die Durchflusszytometrische Analyse	25
2.2	Oligodesoxynukleotide	25
2.2.1	Zur Zellstimulation eingesetzte Sequenzen.....	25
2.2.2	Zur Gelelektrophorese eingesetzte Sequenzen	26
2.2.3	Temperatur-Präinkubation von ODN 2216	29
2.2.4	Temperatur-Präinkubation von ODN M362	29

2.3 Polyvalente Linker	30
2.3.1 Polyvalente Linker - CpG-DNA.....	30
2.3.2 Trivalente Linker - palindromische RNA.....	31
2.3.3 Poly-L-Arginine als Transfektionsreagenzien.....	32
2.3.3.1 Herstellung des ‚Master-Mixes‘ zur Transfektion.....	32
2.4 Zellulär – immunologische Methoden	33
2.4.1 Isolation der gewünschten Zellpopulation	33
2.4.1.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	33
2.4.1.2 Plasmazytoide dendritische Zellen	34
2.4.1.3 Gesamt B-Zellen (CD19 ⁺).....	35
2.4.2 Herstellung autologen Serums	36
2.4.3 Zellkultur	36
2.4.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	37
2.4.4.1 Grundprinzip der FACS-Analyse	37
2.4.4.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit von plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen	38
2.4.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	39
2.4.5.1 Zytokine	39
2.4.5.2 Proliferation (BrdU-ELISA)	40
2.5 Molekularbiologische Methoden	41
2.5.1 Gelelektrophorese	41
2.5.1.1 Prinzip der Gelelektrophorese	41
2.5.1.2 Prinzip der Detektion von Digoxigenin-markierten Oligodesoxynukleotiden	42
2.5.1.3 Prinzip der Detektion von DNA durch Ethidiumbromidfärbung.....	43
2.5.1.4 Durchführung der Gelelektrophorese	43
2.5.1.5 Blotting und Detektion Digoxigenin-markierter Oligodesoxynukleotide	44
2.5.1.6 Färbung mit Ethidiumbromid	45
2.5.1.7 Auswertung der Gelbilder	45
2.5.2 Partikelgrößenbestimmung durch Zetapotenzialmessung	45
2.5.2.1 Grundprinzip	45
2.5.2.2 Durchführung der Messung	46
2.6 Statistische Analyse	47
2.7 Software	47

3	ERGEBNISSE	49
3.1	Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von CpG-A und CpG-C	49
3.1.1	Untersuchung des Klasse A Oligodesoxynukleotids 2216	49
3.1.1.1	CpG-A bildet Nanopartikel im Größenbereich von Viren	49
3.1.1.2	Entwicklung der Temperatur-Präinkubationsmethode zur experimentellen Kontrolle der Multimerisierungen	50
3.1.1.3	Strukturelle Analyse: CpG-A multimerisiert im physiologischen Milieu	51
3.1.1.4	Identifizierung des zentralen Palindroms als notwendiges Element zum Aufbau größerer Partikel aus G-Tetraden	53
3.1.1.5	Identifizierung der Natriumionen als wichtiges stabilisierendes Element zum Aufbau der G-Tetraden	54
3.1.1.6	Große Partikel sind die Voraussetzung zur raschen Induktion hoher Mengen von Interferon-alpha in plasmazytoiden dendritischen Zellen	56
3.1.1.7	Die Präinkubation von PDCs mit Interferon-beta verstärkt die Induktion von Interferon-alpha durch Einzelstränge	58
3.1.1.8	B-Zellen werden von kleinen Partikeln und Einzelsträngen des ODN 2216 nicht aktiviert	59
3.1.1.9	Strukturelle Analyse: Die Multimere öffnen ihre Bindungen bei pH < 6	60
3.1.2	Untersuchung des Klasse C Oligodesoxynukleotids M362	61
3.1.2.1	Strukturelle Analyse bei 4 °C: Die Stabilität der Duplices hängt von den anwesenden Natrium- oder Magnesiumionen ab	61
3.1.2.2	Strukturelle Analyse bei 37°C: Weder Duplices noch Hairpins sind im physiologischen Milieu stabil	63
3.1.2.3	Übertragung der Ergebnisse der strukturellen Analyse auf den Zellversuch	66
3.2	Design immunstimulatorischer Partikel unter Einsatz wirksamer Strukturelemente von CpG-A und CpG-C	67
3.2.1	Polyvalente Linker - palindromische CpG-DNA	67
3.2.1.1	Strukturelle Analyse	68
3.2.1.2	Starke Induktion von Interferon-alpha in PBMCs nach Transfektion mit Poly-L-Arginin	69
3.2.1.3	Screening verschieden langer Poly-L-Arginine als Transfektionsreagenzien	70

3.2.1.4	Poly-L-Arginin verbessert die endozytotische Aufnahme der Polyvalenten Linker	71
3.2.1.5	Untersuchung der CpG-Abhängigkeit des immunstimulatorischen Effektes.....	72
3.2.1.6	Wirkung der transfizierten Polyvalenten Linker auf plasmazytoide dendritische Zellen und B-Zellen	73
3.2.2	Trivalente Linker - palindromische RNA	75
3.2.2.1	Strukturelle Analyse: PVL-RNA multimerisieren zu definiert aufgebauten, großen Strukturen.....	75
3.2.2.2	Induktion von Interferon-alpha in PBMCs nach Transfektion mit Poly-L-Arginin	77
4	DISKUSSION	79
4.1	Methodendiskussion	79
4.1.1	Möglichkeiten und Grenzen der Gelelektrophorese zur Simulation physiologischen Milieus.....	79
4.1.2	Wahrscheinlichkeit von strukturellen Veränderungen der PVL-Partikel durch die Inkubation mit Poly-L-Arginin.....	80
4.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen von ODN 2216 (CpG-A)	83
4.2.1	Zusammenspiel aus Poly-Guanin-Sequenzen, Palindrom und monovalenten Kationen (Na^+/K^+) zur Strukturbildung im physiologischen Milieu	83
4.2.1.1	Bildung von G-Tetraden aus Poly-Guanin-Motiven	83
4.2.1.2	Multimerisierungen von G-Tetraden-Grundstrukturen zu größeren Partikeln mit Hilfe des zentralen Palindroms	84
4.2.1.3	Stabilisierung der G-Tetraden durch zentral eingelagerte monovalente Kationen (Na^+/K^+).....	85
4.2.2	Definierter Partikelbau trotz konzentrationsabhängiger Umlagerungen ..	86
4.2.3	Die Multimerisierung zu höhermolekularen Strukturen ist die Voraussetzung für die hohe Induktion von Interferon-alpha in plasmazytoiden dendritischen Zellen.....	87
4.2.4	Erklärungsmodelle für die hohe Induktion von Interferon-alpha durch große 2216-Partikel	88
4.2.4.1	Aktivierung eines autokrinen <i>feedback-loops</i> für Interferon-alpha durch CpG-A.....	89
4.2.4.2	<i>Clustering</i> und <i>Crosslinking</i> von TLR 9	90
4.2.5	TLR 9-Bindung einzelsträngiger ODN 2216 während der endosomalen Azidifizierung	91

4.2.6 Interpretation der geringen B-Zell-Aktivierung durch CpG-A.....	92
4.3 Das Palindrom als zentrales Element in den Struktur-Wirkungsbeziehungen von ODN M362 (CpG-C)	92
4.3.1 Eigenschaften Palindrom-basierter Strukturen von ODN M362	92
4.3.2 Differenzielles Verhalten Palindrom-basierter Duplices im physiologischen Milieu: Aktivität trotz Strukturlabilität.....	94
4.3.3 Palindrom-basierte (Einzelstrang-) Effekte?.....	98
4.4 Design immunstimulatorischer Partikel unter Einsatz wirksamer Strukturelemente von CpG-A und CpG-C	100
4.4.1 Interpretation der strukturellen Analyse.....	101
4.4.2 Modelle der durch die palindromischen Nukleinsäuren ermöglichten Multimerisierungen trivalenter Linker.....	102
4.4.3 Differenzielles Aufnahmevermögen für große Partikel bei plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen	103
4.4.4 Verbesserte Aufnahme oder wirkungssteigernde Umlagerungen durch Poly-L-Arginin?	104
4.4.5 Palindromische RNA als partikelaufbauendes Element	105
4.5 Ausblick	106
4.5.1 G-Tetraden-basierter Strukturaufbau immunstimulatorischer Partikel	106
4.5.2 Palindrom-basierter Strukturaufbau immunstimulatorischer Partikel.....	107
5 ZUSAMMENFASSUNG	109
6 LITERATURVERZEICHNIS	113
Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	121
Veröffentlichungen	123
Danksagung	124
Lebenslauf	125

1 EINLEITUNG

1.1 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem (lateinisch: *immunis* = frei, unberührt) ist ein komplexes System aus Zellen, Molekülen und Mechanismen, dessen Hauptaufgabe darin besteht, den Körper vor Infektionen durch fremde Substanzen und Organismen, aber auch vor entarteten eigenen Zellen z. B. Tumoren zu schützen. Dieser Unterscheidung zwischen ‚selbst‘ und ‚fremd‘, wie auch ‚harmlos‘ und ‚gefährlich‘, folgen die direkte Bekämpfung der Krankheitserreger und der Aufbau eines wirkungsvollen Schutzsystems gegen das erneute Eindringen des Pathogens.

1.1.1 Die angeborene und die adaptive Immunität

Der Ablauf dieser Immunantwort kann grundsätzlich über zwei unterschiedlich aufgebaute immunologische Effektorsysteme erfolgen: 1) die angeborene (unspezifische) und 2) die adaptive (spezifische) Immunität. Die angeborene Immunität ist bereits auf der Entwicklungsstufe der Eukaryoten entstanden und dient der initialen Abwehr von Krankheitserregern. Sie kann diese jedoch nicht spezifisch erkennen und daher auch keinen Schutz gegen eine erneute Infektion (ein immunologisches Gedächtnis) entwickeln. Der Erkennungsprozess der angeborenen Immunität erfolgt über Rezeptoren, die in der sog. Keimbahn kodiert sind, wodurch ihre Spezifität genetisch festgelegt ist. Dies ist von großem Vorteil, weil gerade diese Rezeptoren, deren Spezifität sich unter dem Selektionsdruck der Evolution herausgebildet hat, nun von Generation zu Generation weiter gegeben werden. Sie werden *pattern recognition receptors* (PRRs) genannt und erkennen evolutiv hoch-konservierte Strukturen, die viele Mikroorganismen gemeinsam haben. Diese Strukturen werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet und sind nicht im Wirtsorganismus zu finden. Sie sind jedoch essentiell für das Überleben der Erreger oder manchmal deren Pathogenitätsdeterminanten.

Eine erste Barrierefunktion gegen extrazelluläre Erreger erfüllen die Epithelien, welche die inneren und äußeren Oberflächen des Körpers bedecken, die Opsonisierung durch Komplementaktivierung sowie die Erkennung und Beseitigung der Mikroorganismen durch Makrophagen. Bei intrazellulären Erregern gestaltet sich die Abwehr schwieriger. Eine wichtige Rolle spielen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die die befallenen Zellen erkennen und vernichten, und Interferone (IFN) - Zytokine, die den Körper in eine Art Alarmzustand versetzen und als Katalysatoren der Immunantwort die zelluläre Immunität initiieren.

Auch wenn das angeborene Abwehrsystem gerade für die frühe Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist, gelingt es ihm jedoch häufig nicht alleine, den Erreger zu vernichten. Ein infektiöser Organismus, der diese ersten Abwehrlinien durchbricht, muss dann über die adaptive Immunantwort bekämpft werden. Diese unterscheidet sich von der angeborenen Immunität aufgrund der spezifischen Erkennung der Mikroben und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das einen stärkeren Schutz gegen eine erneute Infektion bietet. Hauptakteure der adaptiven Immunität sind Antigen-präsentierende Zellen (APCs), darunter fallen vor allem die dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen, aber auch B-Zellen.

Die wichtigste Funktion erfüllen jedoch T- und B-Lymphozyten mit Antigen-spezifischen Rezeptoren, welche durch klonale Selektion entstanden sind. Jeder dieser Lymphozyten ist mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausgestattet. Da diese Rezeptoren nicht in der Keimbahn kodiert sind, sind sie nicht prädestiniert, ein bestimmtes Antigen zu erkennen. Vielmehr werden aus der Vielzahl zufällig generierter Rezeptoren im Laufe des Lebens durch positive und negative Selektionsmechanismen nur diejenigen ausgewählt und klonal expandiert, die ein Fremd-Antigen erkennen. Im Lymphknoten verursacht die Antigen-Präsentation der DCs die klonale Expansion der entsprechenden Lymphozytenklone und die adaptive Immunantwort, indem extrazelluläre Infektionserreger von den durch B-Zellen produzierten Antikörpern gebunden werden und T-Zellen infizierte Zellen töten und andere Immunzellen unterstützen. Ein Teil dieser proliferierenden Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen. Die Aktivierung der T- und B-Zellen hängt neben den T- und B-Zell-Interaktionen auch von den kostimulatorischen Molekülen und Zytokinen der angeborenen Immunität ab, daher resultiert eine effektive Immunantwort immer aus wirkungsvollen Interaktionen zwischen angeborener und adaptiver Immunität.

1.1.2 *Toll-like* Rezeptoren - Erkennungssysteme der angeborenen Immunität

Zu den wichtigsten Vertretern der PRRs zählt die Familie der *Toll-like* Rezeptoren. Das Toll Protein wurde erstmalig in der Drosophila-Fliege als Molekül identifiziert, das die dorsoventrale Polarität in der Embryogenese bestimmt und eine Rolle in der antifungalen Abwehr des Organismus spielt [Lemaitre et al. 1996]. Eine dem Toll homologe Rezeptorfamilie, die *Toll-like* Rezeptoren (TLR), wurden schon bald bei Vertebraten identifiziert [Medzhitov et al. 1997]. *Toll-like* Rezeptoren zählen zu den evolutionär hoch konservierten Typ-I Transmembranproteinen [Anderson 2000]. Die extrazelluläre Domäne enthält *leucine rich repeats* (LRRs). Die intrazelluläre, zytoplasmatische Region ähnelt dem IL-1 Rezeptor, daher wird sie auch TIR (Toll/IL-1 Rezeptor) genannt, und enthält drei immunglobulinartige Domänen. Bis heute sind in Vertebraten 13 TLR, im humanen System 10 TLR identifiziert worden [Hornung et al. 2002; Takeda et al. 2003] und viele Liganden, zumeist mikrobiellen Ursprungs, beschrieben [Barton und Medzhitov 2003; Underhill 2003]. Zusätzlich werden auch endogene Liganden diskutiert, die während einer Entzündungsreaktion freigesetzt werden [Matzinger 1998]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die humanen *Toll-like* Rezeptoren und ihre Liganden. Die TLR 1, 2 und 6 können ihr PAMP-Erkennungsspektrum erhöhen, indem sie in Rezeptorwechselwirkungen treten und heterodimerisieren [Ozinsky et al. 2000].

CpG-DNA viralen oder bakteriellen Ursprungs wird über den TLR 9 erkannt [Hemmi et al. 2000]. Dieser wird beim Menschen in plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) und B-Zellen exprimiert und befindet sich im Gegensatz zu den meisten anderen TLR nicht auf der Zelloberfläche sondern im endoplasmatischen Retikulum, wo die Nukleinsäuren nach der Internalisierung der Viren und Bakterien freigesetzt werden. Die Interaktion von CpG-DNA und TLR 9 erfolgt während der endosomalen Reifung. Dabei kommt es zu einem Anschwellen und Ansäuern des Endosoms und der Erzeugung von reaktiven Sauerstoff-Spezies [Yi et al. 1998]. Weitere an der Erkennung viraler und bakterieller Nukleinsäuren beteiligte TLR sind TLR 3 (Ligand: doppelsträngige RNA, dsRNA) und TLR 7 und 8 (Liganden: einzelsträngige RNA, ssRNA; Imidazoquinoline), welche ebenfalls in den endosomalen Kompartimenten der Zelle exprimiert werden (Tabelle 1).

Seit kurzem werden außerdem TLR-unabhängige zytosolische Wege zur Detektion viraler Nukleinsäuren in der Literatur diskutiert, die ebenfalls antivirale Mechanismen wie z.B. die Produktion von Typ-I Interferon auslösen [Hornung et al. 2004, Yoneyama et al. 2004, Ishii et al. 2006, Stetson und Medzhitov 2006].

Tabelle 1: Humane *Toll-like* Rezeptoren und ihre Liganden

TLR	Ligand	Lokalisation	Referenz
1 + 2	Triacyl-Lipopeptide	Zelloberfläche	[Takeuchi et al. 1999a]
2	Lipoteichonsäure	Zelloberfläche	[Ozinsky et al. 2000]
2 + 6	Diacylllipopeptide	Zelloberfläche	[Takeuchi et al. 1999b]
3	dsRNA	Endosomale Kompartimente	[Alexopoulou et al. 2001]
4	LPS	Zelloberfläche	[Poltorak et al. 1998]
5	Flagellin	Zelloberfläche	[Hayashi et al. 2001]
7	ssRNA, Imidazoquinoline z.B. Resiquimod (R848)	Endosomale Kompartimente	[Heil et al. 2004]
8	ssRNA, Imidazoquinoline z.B. Resiquimod (R848)	Endosomale Kompartimente	[Heil et al. 2004]
9	unmethylierte CpG-DNA	Endosomale Kompartimente	[Hemmi et al. 2000]
10	unbekannt	Zelloberfläche	

Nach der Aktivierung der TLR kommt es zu der Rekrutierung von Adaptormolekülen und der Induktion von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, was schließlich zur Produktion wichtiger Mediatoren der angeborenen Immunität, wie z.B. Zytokinen und Chemokinen, führt. Gleichzeitig werden kostimulatorische Moleküle für die Induktion der adaptiven Immunantwort freigesetzt. Die Signalwege der TLR 3, 7, 8 und 9 werden in Abbildung 1 schematisiert beschrieben (die Legende der Abkürzungen befindet sich unter Abbildung 1): Die Ligandenbindung von TLR 7, 8, 9 führt zu der Rekrutierung von MyD88 und dessen Komplexbildung mit IRAK und TRAF6, welches in die Aktivierung von NFκB, MAP-Kinasen und IRF-7 mündet. Eine TLR 3-vermittelte Zell-Aktivierung verläuft über TRIF-abhängige Signalwege, die über den TBK1/IKK Komplex zur

Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 führen, was letztendlich ebenfalls zur Expression kostimulatorischer Proteine und proinflammatorischer Zytokine führt.

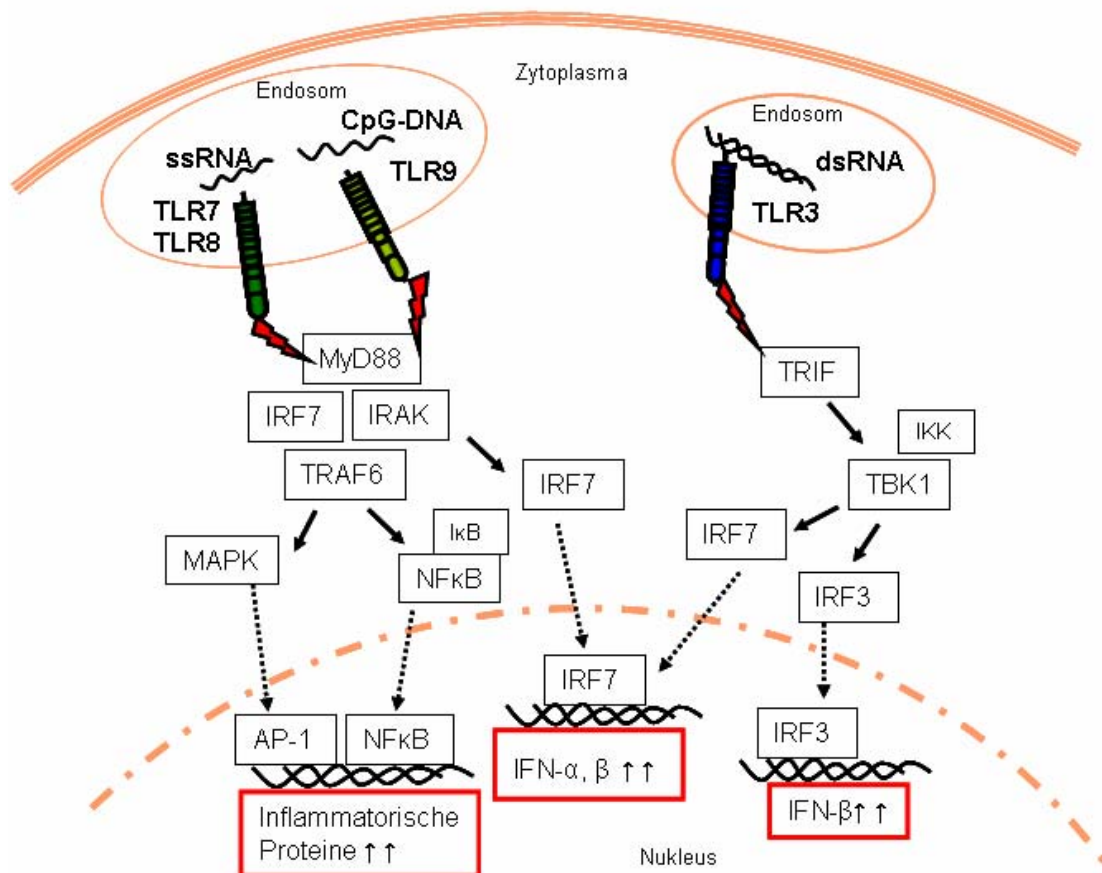


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Signalwege von TLR 3, 7, 8 und 9

Die Ligandenbindung von TLR 7, 8 oder 9 führt zu der Assoziierung der zytoplasmatischen TIR-Domäne des Rezeptors mit MyD88 und zu der Rekrutierung von IRAK zum Rezeptorkomplex. IRAK aktiviert TRAF6, dies aktiviert einen IKK-Komplex, welcher die inhibitorischen-κB-Proteine phosphoryliert. Danach kann NFκB in den Nukleus transmigrieren und durch die Bindung an Targetsequenzen von Promotoren verschiedener Gene deren Transkription initiieren. Die Aktivierung mehrerer MAP-Kinase-Kaskaden durch den MyD88/IRAK/TRAF6 Rezeptorkomplex führt ebenfalls zur Induktion inflammatorischer Proteine. Die Rolle von IRF-7 in der Induktion von Typ-I Interferon wird darüber hinaus in 4.2.4.1 diskutiert.

In der Signaltransduktion von TLR 3 kommt es über die MyD88-unabhängige Aktivierung von TRIF über IKK und TBK-1 zu der Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 und nach deren Translokation in den Nukleus zu der Induktion von IFN-abhängigen Genen.

(MyD88: myeloider Differenzierungsfaktor 88; IKK: IκB-Kinase; IκB: inhibitorische-κB-Proteine; IRAK: Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase; IRF-3/7: IFN *regulatory factor* 3/7; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; NFκB: *nuclear-factor*-κB; TBK1: *TANK-binding-kinase-1*; TIR: TLR/IL-1-Rezeptor; TRAF 6: Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiierter Faktor 6; TRIF: *TIR domain-containing adapter inducing* IFN-β)

1.1.3 Typ-I Interferon - ein Effektor der angeborenen Immunität

1967 entdeckten Isaacs und Lindemann, dass lebende Zellen nach Stimulation mit hitze-inaktivierten Influenzaviren ein Protein sezernierten. Wurde dieses zu virusinfizierten Zellen gegeben, interferierte es mit der viralen Replikation, indem es das Virus hinderte, auf uninfizierte Zellen überzugreifen. Aus diesem Grund gab man ihm den Namen ‚Interferon‘ (IFN) [Isaacs und Lindenmann 1987]. Bis heute konnte man eine ganze Familie von Interferon-Proteinen identifizieren, die grundsätzlich in zwei Subpopulationen, nämlich Typ-I und Typ-II, eingeteilt werden [Farrar und Schreiber 1993; Pestka 2000]. Als Typ-I Interferon (*viral interferon*) werden die antiviralen Zytokine IFN- α , IFN- β , IFN- ω bezeichnet. Diese Zusammenfassung von IFN- α und IFN- β als Typ-I beruht auf einer phylogenetischen Verwandtschaft mit ca. 300 Millionen (Mio.) Jahre alten gemeinsamen Vorgängern von Säugetieren, Reptilien und Fischen. Hauptproduzenten von endogenem IFN- α sind im menschlichen Organismus die PDCs; sie produzieren um den Faktor 10^3 mehr Interferon- α als andere Zellen nach viralem Stimulus. Es sind mindestens 14 verschiedene Subtypen von IFN- α bekannt, die jeweils von unterschiedlichen Genen kodiert werden. IFN- β , IFN- ω und IFN- τ werden hingegen durch ein einziges Gen kodiert. Diese Gene sitzen auf einem gemeinsamen Chromosom, dem Chromosom 9 (beim Menschen). Alle Interferone dieser Klasse besitzen einen gemeinsamen Typ-I Interferon Rezeptor, der sehr Spezies-spezifisch ist.

Typ-I Interferone werden rasch nach mikrobiellen Stimuli sezerniert. Ihre antiviralen Effekte beruhen vor allem auf zwei Mechanismen, die zur Hemmung der viralen Proteinsynthese und schließlich zum Zelltod führen: 1) der Induktion einer 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase, welche durch die virale dsRNA aktiviert wird und deren *messenger* RNA (mRNA) degradiert und 2) der Induktion der Phosphorylierung zellulärer Proteine, speziell des *eucaryotic initiation factor 2 α* (eIF2 α), welche sonst die virale Proteinsynthese initiieren [Isaacs und Lindenmann 1987; Katze et al. 2002]. IFN besitzt neben den antiviralen auch wichtige immunmodulierende Funktionen für die Aktivierung des spezifischen Immunsystems gegen die infizierte Zelle. Es kommt zu einer verstärkten Expression von MHC-I Molekülen auf der Zelloberfläche und dadurch zu einer erhöhten Präsentation viraler Antigene [Biron 1999; Biron 2001]. Darüber hinaus steigert Typ-I Interferon die Zytotoxizität von Makrophagen und NK-Zellen [Ortaldo et al. 1983] und fördert die Aktivierung und Proliferation von CD-8 Gedächtnis-T-Zellen durch Induktion von IL-15 [Zhang et al. 1998]. IFN- α führt zur

Ausreifung myeloider DCs und zur Induktion von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen [Ito et al. 2001]. Es fördert das Überleben aktivierter T-Zellen [Marrack et al. 1999] und begünstigt die spezifische Antikörperproduktion von B-Zellen [Le Bon et al. 2001]. Dadurch ist es unabdingbar in der Induktion einer effektiven spezifischen Immunantwort gegen Viren [Muller et al. 1994] wie auch gegen Bakterien und Protozoen [Bogdan 2000]. Rekombinantes Typ-I IFN ist vor allem zur Therapie von Hepatitis B und C zugelassen, findet seinen Einsatz aber auch unter anderem in der Therapie von Multipler Sklerose, Melanom- und Sarkomarten. Möglicherweise wäre es jedoch eine elegantere, besser verträgliche wie auch kostengünstigere Methode, das Interferon körpereigen durch Aktivierung der PDCs mittels CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) zu produzieren. Das Klasse-C ODN Actilon® (Firma Coley) befindet sich zurzeit in der Phase I/II klinischer Studien zur Therapie von Hepatitis C.

1.1.4 Dendritische Zellen - Mittler zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität

Dendritische Zellen (DCs) können als hochspezialisierte APCs Antigen-spezifische Immunantworten initiieren und regulieren. Sie wurden erstmalig 1973 von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben und sind nach ihren charakteristischen bäumchenartigen Zytoplasma-Ausläufern im mikroskopischen Erscheinungsbild benannt (lateinisch: *dendriticus* = verzweigt; griechisch: *dendros* = Baum). DCs bilden in beinahe allen Geweben ein dichtes Netzwerk von Wächterzellen, die Rezeptor-vermittelt, durch Pino-, Endo- bzw. Phagozytose oder durch Infektion extrazelluläre Bestandteile aufnehmen und somit ihre Umgebung permanent analysieren. Aufgenommene Proteine werden intrazellulär zu Peptiden prozessiert und an Moleküle des *major-histocompatibility-complex-II* (MHC-II) gebunden auf der Zelloberfläche für T-Lymphozyten erkennbar gemacht.

Die Antigenaufnahme aktiviert Signalkaskaden der angeborenen Immunantwort (z. B. die TLR-Signalwege) und es kommt zu der Sekretion von Zytokinen (z. B. IFN- α), die NK-Zellen direkt aktivieren. Die DCs wandern nun durch die drainierende Lymphe in die regionalen Lymphknoten, wo sie im Zuge ihrer Reifung die Phagozytosefähigkeit verlieren und stattdessen vermehrt Oberflächenmoleküle, wie CD80, CD86 und CD40 exprimieren (CD = *Cluster of differentiation*, Zelloberflächenantigene). Im Lymphknoten

kommt es zum Kontakt mit naiven T-Zellen. Die Erkennung des Antigen/MHC-II Komplexes auf den DCs durch deren T-Zell-Rezeptor, die kostimulatorischen Interaktionen der beiderseitigen Oberflächenmoleküle sowie das Zytokinmilieu führen letztendlich zur klonalen Expansion und Differenzierung dieser für das Antigen spezifischen T-Zellen. Sie können dann über die Lymphe und das Blut den Ort der Gewebsschädigung aufsuchen und ihre Funktion als Effektoren der adaptiven Immunantwort erfüllen. Aus intakten Geweben erreichen inaktivierte DCs den Lymphknoten und führen zur Toleranz oder Anergie der T-Zellen gegenüber dem präsentierten Antigen. So wird möglicherweise das Auftreten von pathologischen Autoimmunprozessen verhindert [Banchereau und Steinman 1998]. Humane DCs werden mehrheitlich in DCs myeloiden oder lymphoiden Ursprungs unterteilt und können nach Herkunft, Differenzierungsstadium und ihren unterschiedlichen Fähigkeiten charakterisiert werden. Im peripheren Blut werden zwei Subpopulationen unterschieden: die CD11c⁺ CD123^{low} myeloiden DCs (MDCs) und die CD11c⁻ CD123^{high} plasmazytoiden DCs (PDCs) [O'Doherty et al. 1994; Olweus et al. 1997].

PDCs bilden eine kleine Population von 0,2-0,8 % der mononukleären Zellen des peripheren Blutes, welche vor allem in den sekundären lymphatischen Organen zu finden ist [Liu 2005]. Anhand ihres Phänotyps werden sie als CD4⁺, CD123⁺, CD11c⁻, CD45RA⁺, Lin⁻ und MHC-II⁺ definiert [Svensson et al. 1996]. Erstmals wurde 1958 durch Lennert und Remmele von einer Zelle berichtet, die morphologisch große Ähnlichkeit mit einer Plasmazelle hat und sich in den T-Zell-Regionen des Lymphknotens nahe der HEV (*high endothelial venules*, postkapilläre Venolen mit hohem Endothelanteil) befindet [Lennert und Remmele 1958]. Nachdem diese in den folgenden Jahren mühsam charakterisiert und mehrfach umbenannt wurde, konnte 1999 durch zwei Forschergruppen unabhängig voneinander nachgewiesen werden, dass die PDC identisch ist mit einer zuvor IPC (*interferon producing cell*) genannten Zellpopulation, die als Hauptproduzent von Typ-I Interferon galt [Cella et al. 1999; Siegal et al. 1999]. Der Mangel an spezifischen Oberflächenmolekülen, die die Charakterisierung und Identifizierung der PDC ermöglichen, erschwerte zunächst die Experimente mit diesem seltenen Zelltyp. Erst die Entdeckung von BDCA-2 und BDCA-4 (*blood dendritic cell antigen*) als PDC-spezifische Oberflächenantigene ermöglichte die Identifizierung und unkomplizierte Isolation dieser Zellen [Dzionek et al. 2000].

Die PDC exprimiert vor allem TLR 7 und 9 [Hornung et al. 2002]. Sie ist damit primär auf die Erkennung von Viren und Bakterien spezialisiert und in der Lage, daraufhin große Mengen Interferon-alpha (IFN- α) - bis zu 10 pg pro Zelle - zu produzieren [Siegal et al. 1999]. Weitere Zytokine und Chemokine, die von einer aktivierten PDC sezerniert werden, sind IL-6, TNF- α und IL-8.

Die Fähigkeit der PDC, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und über MHC-II zu präsentieren, ist verglichen mit einer ‚klassischen‘ DC relativ gering. Sie verfügt nur unzureichend über Prozesse wie Phagozytose und Makropinozytose [Grouard et al. 1997]. Daher ist die Bezeichnung ‚Antigen-präsentierende Zelle‘ für die PDC umstritten. Unreife PDCs exprimieren konstitutiv wenig MHC-II und nahezu nicht-detektierbare Mengen an kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche. Nach Aktivierung durch ein Pathogen, einem TLR 7- oder TLR 9-Liganden oder durch CD40-Ligand (CD40L) wird jedoch ihr Reifungsprozess ausgelöst, der die Expression an Oberflächenmolekülen und kostimulatorischen Molekülen steigert und der PDC die Fähigkeit gibt, mit T-Zellen zu interagieren und sie zu aktivieren. Dabei lenken Virus-infizierte PDCs durch die Ausschüttung von IFN- α die T-Zell-Entwicklung vorzugsweise in Richtung einer T_H-1-Antwort. Reifen PDCs jedoch ohne pathogenen Stimulus in Gegenwart von IL-3, so können sie eine schwache T_H-2-Antwort induzieren [Rissoan et al. 1999]. Durch die Ausschüttung von Zytokinen (allen voran IFN- α) und durch interzelluläre Interaktionen können PDCs eine Vielzahl anderer Effektorzellen des Immunsystems aktivieren, wie MDCs, Makrophagen, NK-Zellen, NKT-Zellen und T-Zellen [Ito et al. 2001; Rothenfusser et al. 2001; Kadowaki und Liu 2002]. PDCs erfüllen dadurch eine zentrale Funktion sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort

1.1.5 B-Zellen - Effektorzellen der adaptiven Immunität

B-Zellen gehören zu den Hauptakteuren der adaptiven Immunantwort und sind als einzige Zellpopulation fähig, lösliche Antigene im Extrazellulärraum zu erkennen. Die Bezeichnung B-Zelle stammt ursprünglich von ihrem Bildungsort in der *bursa fabricii* bei Vögeln. Bei Säugetieren entstehen sie im Knochenmark. Die Aktivierung naiver B-Zellen erfordert primär zwei Signale: 1) die Bindung des Antigens an den B-Zellrezeptor (BCR) und 2) eine T-Zell-abhängige oder -unabhängige Kostimulation.

Nach Internalisierung durch BCR-vermittelte Endozytose wird das Antigen abgebaut und die Peptidfragmente an MHC-II Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche den CD4⁺ T-Lymphozyten präsentiert [Lanzavecchia 1990]. Die für das Antigen spezifische T-Zelle erkennt mit ihrem TCR diesen Peptid-MHC-II Komplex und produziert CD40-Ligand, welcher an CD40 auf der B-Zelloberfläche bindet und diese gemeinsam mit dem BCR-Antigen-Signal aktiviert. Außerdem sezerniert die T-Zelle Effektormoleküle, wie die Zytokine IL-2, IL-4, IL-5 und IL-6, die modulierend wirken und die B-Zelle (als drittes Signal) zusätzlich aktivieren [Liu et al. 1992]. Eine T-Zell-unabhängige Kostimulation kann durch TLR-Signale vermittelt ablaufen, wobei vor allem TLR 7 und TLR 9 eine Rolle spielen. Bei humanen B-Zellen ist der TLR 9 ebenso wie TLR 1, 6 und 10 hoch exprimiert und die Aktivierung der Zellen durch den TLR 9-Liganden CpG-DNA ein gut etabliertes System. Darüber hinaus exprimieren humane B-Zellen mittlere Level an TLR 7 und nur geringe Mengen an TLR 2 und 4 [Hornung et al. 2002]. IFN- α führt jedoch zu einer selektiven Aufregulation des TLR 7, daher verstärken anwesende und durch TLR 7-Liganden zu IFN-Sekretion stimulierte PDCs eine entsprechende Aktivierung von B-Zellen. Die TLR 9-vermittelte Kostimulation der B-Zellen erfolgt dagegen unabhängig von anwesenden PDCs [Bekeredjian-Ding et al. 2005].

Die Aktivierung führt zur klonalen Expansion der Zellen. Nach ihrer Proliferation differenzieren sie zu kurzlebigen Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen. Der Plasmazellklon produziert zunächst vor allem Antikörper des Ig-M Isotyps (Ig = Immunglobulin), die zwar eine relativ geringe Affinität zu dem Antigen besitzen, jedoch vor allem durch Komplementaktivierung einen sofortigen Schutz vor dem Antigen bieten. Nach dem Isotypenwechsel während der Differenzierung werden Ig-G Antikörper gebildet und die Plasmazellen in Hinblick auf eine erhöhte Affinität zu ihrem Antigen selektiert. B-Gedächtniszellen können auch ohne das spezifische Antigen lange überleben und verlieren in dieser Zeit die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren [Maruyama et al. 2000]. Erst auf den erneuten Kontakt folgt eine klonale Expansion, die 8-10x mehr Plasmazellen als bei der primären Immunantwort generiert [McHeyzer-Williams und Ahmed 1999]. B-Gedächtniszellen werden von TLR 7- oder TLR 9-Liganden auch ohne BCR-Antigen-Signal oder T-Zell-Hilfe aktiviert [Bekeredjian-Ding et al. 2005] - eine Eigenschaft, die man durch die Entwicklung potenter Liganden dieser TLR als Vakzine-Adjuvantien zu nutzen versucht.

1.2 CpG-Oligodesoxynukleotide

1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund: Von bakteriellen Lysaten zu synthetischer CpG-DNA

Bis vor wenigen Jahren noch wurde die DNA in Lehrbüchern ausschließlich als biologischer Speicherort des Genoms betrachtet. Mittlerweile muss man die funktionelle Bedeutung jedoch weiter fassen. Man hatte erkannt, dass es Unterschiede im Aufbau von bakterieller oder viraler DNA (sog. CpG-Motive) im Vergleich zur Wirbeltier-DNA gibt, die es dem Immunsystem ermöglichen, diese als potenzielle Krankheitserreger zu erkennen. CpG-Motive sind unmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen. Synthetische Oligodesoxynukleotide (ODN), die solche unmethylierten CpG-Motive enthalten, imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und induzieren somit ein charakteristisches Aktivierungsmuster in Immunzellen. Erste klinische Studien mit diesen Sequenzen haben die günstigen Eigenschaften von CpG-ODN z. B. als Vakzine-Adjuvans beim Menschen bestätigt. Derzeit werden CpG-ODN zur Therapie von Tumorerkrankungen, Infektionserkrankungen, Allergien und Asthma bronchiale klinisch geprüft.

Berichte über den heilungsfördernden Einfluss bakterieller Infektionen auf den Verlauf maligner Erkrankungen reichen schon bis in das 17. Jahrhundert zurück. Ende des 19. Jahrhunderts gelang es William Coley, der mehrere Sarkompatienten mit bakteriellen Lysaten behandelte, erstmalig, bei einem Teil der Patienten einen vorübergehenden Rückgang der Tumore zu erreichen [Nauts und McLaren 1990; Coley 1991]. Diese Arbeit war die Grundsteinlegung der heutigen Immuntherapie von Tumoren, geriet jedoch zu der damaligen Zeit in Vergessenheit, denn andere, besser standardisierbare und erfolgsverheißendere Therapieansätze, wie z. B. die Strahlentherapie, standen im Fokus des medizinischen Interesses [Coley 1991; Wiemann und Starnes 1994]. Erst die wachsenden Fortschritte und Erkenntnisse auf dem Gebiet des Immunsystems führten fast 100 Jahre später zu einem besseren Verständnis der Wirkmechanismen bakterieller Lysate. Es gelang Tokunaga et al. zu zeigen, dass der antitumorale Effekt des bakteriellen Lysates von Tuberkelbakterien auf der Stimulation des Immunsystems durch die bakterielle DNA beruht [Tokunaga et al. 1984]. Yamamoto wies im Folgenden nach, dass nicht die DNA von

Wirbeltieren, jedoch die DNA von Bakterien diese immunstimulatorische Aktivität aufweist [Yamamoto et al. 1992b]. Ähnliche Effekte ließen sich auch mit kurzen einzelsträngigen (ss) DNA-Molekülen erzielen, die ein zentrales Cytidin-Guanosin (CG)-Dinukleotid enthielten, welches von anderen Basen palindromartig flankiert wurde [Yamamoto et al. 1992a]. Man folgerte, dass die palindromartige Anordnung der Basen eine Voraussetzung sei, um Sekundärstrukturen, wie z. B. ‚stem loops‘ auszubilden, welche dem Immunsystem des Wirbeltierorganismus als Erkennungsstrukturen dienen [Kuramoto et al. 1992]. Daneben zeigte die Gruppe um Messina, dass bakterielle DNA murine B-Zellen zur Proliferation und Immunglobulinsekretion anregte, wobei durch Methylierung des Cytosins ein Verlust der Wirkung zu beobachten war [Messina et al. 1991; Messina et al. 1993]. Eine Erklärungsmöglichkeit war in ihren Augen, dass die Methylierung des Cytosins eine Ausbildung höherer Strukturen hindere und daher diese Strukturen von Wichtigkeit für die immunstimulatorische Wirkung seien.

70 % der Cytosin Moleküle in CpG-Dinukleotiden der Vertebraten-DNA sind an der 5'-Position methyliert, wohingegen sie in bakterieller DNA vollständig unmethyliert vorkommen. Das CpG-Motiv tritt in bakterieller DNA mit einer Häufigkeit von 1:16 auf und damit deutlich häufiger als in Wirbeltier-DNA, wo sie mit 1:60 beschrieben wird. Unter anderem wird die gezielte Umwandlung von methyliertem Cytosin zu Thymin (z. B. bei der oxidativen Desaminierung oder durch Mutation) für die Supprimierung der CpG-Dinukleotide in Vertebraten verantwortlich gemacht, auch wenn der genaue Regulationsmechanismus bisher unbekannt ist. Aus evolutiver Sicht bedeutet dies eine hocheffiziente Abwehrstrategie, die dem humanen Immunsystem die Erkennung potenzieller Pathogene ermöglicht [Krieg 2002].

Durch die Antisense Technologie wurden schließlich Verfahren entwickelt, die die DNA Synthese auch in großem Maßstab ermöglichten. Man arbeitete mit synthetischen einzelsträngigen ODN von ca. 20 Basen Länge, die - wie synthetische DNA im Allgemeinen - unmethyliert waren. Arthur Krieg machte 1995 bei Antisense Experimenten die Beobachtung, dass bestimmte ODN immunstimulierende Eigenschaften hatten, weil sie murine B-Zellen zur Proliferation anregten. Dieser Effekt erwies sich als abhängig von mindestens einem zentralen CpG-Dinukleotid, denn sowohl GpC-Kontroll-ODN als auch am Cytosin methylierte ODN verloren diese Eigenschaft. Obwohl die flankierenden Basen einen Einfluss auf die Wirkung zu haben schienen, musste ihre Anordnung nicht zwingend palindromartig sein. Daher war hier im Gegensatz zu den Beobachtungen von Tokunaga, Yamamoto und Pisetsky die

Ausbildung einer höhermolekularen Sekundärstruktur nicht zwingende Voraussetzung für die immunstimulierende Wirkung [Krieg et al. 1995]. Schnell zeigte sich, dass zwischen den Spezies unterschiedliche Motive besonders aktivierend wirken. So wurde im humanen System das für eine optimale Stimulation minimal erforderliche Motiv mit dem Hexamer 5'-GTCGTT-3' ermittelt [Hartmann und Krieg 2000]; im murinen System wirkt dagegen das Motiv 5'-GACGTT-3' optimal stimulierend [Bauer et al. 2001].

1.2.2 Wirkung und Wirkmechanismen von CpG-DNA

Im Tierversuch wurde ermittelt, dass die systemische CpG-Applikation ein starkes T_H-1-Zytokinmilieu schafft, welches sich durch hohe IFN- γ und IL-12 Spiegel auszeichnet [Klinman et al. 1996]. Darüber hinaus wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass CpG-DNA in Hinblick auf humorale und zelluläre Antigen-spezifische Immunantworten ein potentes Adjuvans darstellt (Modell-Protein und Peptid-Antigene [Chu et al. 1997; Lipford et al. 1997], virale und bakterielle Proteine [Davis et al. 1998; Moldoveanu et al. 1998], Tumorentigene [Sun et al. 1996] und Polysaccharide [Chelvarajan et al. 1999]). Lange Zeit wurde über die molekularen Mechanismen der Aktivierung von Immunzellen durch CpG spekuliert. Schließlich konnte durch Untersuchungen an *knock-out* Mäusen gezeigt werden, dass die CpG-Erkennung über den TLR 9 abläuft [Hemmi et al. 2000]. Diese Beobachtung konnte im humanen System bestätigt werden [Bauer et al. 2001].

Durch die Arbeiten von Eicke Latz ist mittlerweile klar, dass CpG ODN durch einen Clathrin-abhängigen Weg endozytotisch aufgenommen und aus den frühen Endosomen zu einem tubulären lysosomalen Kompartiment transportiert werden. Zur gleichen Zeit bewegt sich TLR 9 zu den CpG-DNA-enthaltenden Kompartimenten, außerdem kommt es dort zu einer Anreicherung von MyD88. Es folgt eine direkte und sequenzunabhängige Bindung der CpG-DNA an TLR 9. Nicht-stimulative GpC-DNA kann zwar an den TLR 9 binden, löst jedoch keine Aktivierung aus. Durch Zugabe steigender Konzentrationen dieser inaktiven Sequenzen konnte die CpG-bedingte NF κ B-Aktivierung – nicht jedoch die IL-1-Induktion – gesenkt werden. Beide Sequenzen konkurrierten konzentrationsabhängig um die TLR 9-Bindung. Diese Untersuchungen wurden mit CpG-B, ODN 2006, durchgeführt [Latz et al. 2004]. Einige

Arbeitsgruppen diskutieren darüber hinaus einen CpG-unabhängigen, Phosphorothioat-abhängigen Effekt [Bartz et al. 2004; Roberts et al. 2005].

- PDCs tragen große Mengen TLR 9 und sind damit prädestiniert für die CpG-Erkennung [Hornung et al. 2002]. Neben einer verstärkten Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle kommt es zur verstärkten Sekretion von IL-6 und TNF- α , sowie je nach CpG-Sequenz zu so großen Mengen IFN- α , wie sonst nur bei einer Virusinfektion. Außerdem fördert CpG-DNA das Überleben der PDCs *in vitro* und verstärkt die Expression des Reifungsmarkers CD83, der die PDC zu einem potenten Stimulus allogener T-Zellen macht [Krug et al. 2001].
- B-Zellen, die ebenfalls TLR 9 tragen, werden nach CpG-Stimulation zur Proliferation angeregt [Krieg et al. 1995]. Innerhalb weniger Stunden kommt es zur Produktion von IL-10 und IL-6, welche für die nachfolgende Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen wichtig sind [Yi et al. 1996; Redford et al. 1998]. Daneben werden verstärkt die Oberflächenmoleküle MHC-II, CD80, CD86, CD40 und CD54 exprimiert [Krieg et al. 1995; Davis et al. 1998; Hartmann und Krieg 2000]. Außerdem kann CpG-DNA die Apoptose von primären B-Zellen in der *in-vitro* Kultur unterbinden [Yi et al. 1998].
- NK-Zellen werden indirekt durch die von Antigen-präsentierenden Zellen nach CpG-Aktivierung ausgeschütteten Zytokine IL-12, Typ-I Interferon und TNF- α stimuliert und reagieren mit der Produktion von IFN- γ und gesteigerter lytischer Aktivität [Ballas et al. 1996].
- Bei T-Zellen wurde eine CpG-Motiv-abhängige Aktivierung von TCR-stimulierten T-Zellen durch CpG-Sequenzen gezeigt [Iho et al. 1999]. Andere Arbeitsgruppen diskutieren einen Motiv-unabhängigen Effekt durch Poly-Guanin-Abschnitte im Rückgrat stimulierender ODN [Lipford et al. 2000].

1.2.3 Definition von drei Klassen synthetischer CpG-ODN: CpG-A, CpG-B und CpG-C

Durch Screening-Experimente gelang es, die optimal stimulierenden Sequenzen zu identifizieren. Hier spielen sowohl die Häufigkeit und Position der CpG-Motive wie auch das Vorhandensein eines Palindroms in den flankierenden Basen sowie deren generelle Abfolge eine entscheidende Rolle. Ein gewisser Einfluss kommt auch von der (modifizierten) Bindungsart der Nukleotide als Phosphorothioatbindung, die im Gegensatz zur (regulären) Phosphodiesterbindung eine höhere Nukleasestabilität und bessere Aufnahme in die Zelle aufweist [Kandimalla et al. 2002] (Phosphorothioat = PTO). Bisher wurden drei CpG-Klassen zunächst vor allem aufgrund ihres unterschiedlichen immunstimulatorischen Wirkprofils definiert:

- CpG-A (auch: CpG-D), Prototyp ODN 2216 [Krug et al. 2001]

Charakteristisch sind die größtenteils PTO-gebundenen Poly-Guanin-Sequenzen am 5'- und 3'-Ende, sog. Poly-G Motive. Das palindromische CpG-beinhaltende Zentrum ist dagegen phosphodiestergebunden. Dieser chimärische Aufbau gewährleistet eine hohe Aktivität hinsichtlich der Aktivierung von NK-Zellen und der Induktion von IFN- α [Ballas et al. 1996]. Die Poly-G Motive verbessern die zelluläre Aufnahme [Agrawal et al. 1996; Dalpke et al. 2002; Bartz et al. 2004] und zusätzlich die NK-Zell-Aktivierung. Darüber hinaus bilden sie spontan sehr stabile höhermolekulare, über G-Tetraden stabilisierte Strukturen aus [Kerkmann et al. 2005]. Durch selektive Verbesserung der CD8⁺ T-Zell-Antwort induziert ODN 2216 Zytotoxizität [Rothenfusser et al. 2004]. Die Fähigkeit, B-Zellen zu aktivieren, ist im Vergleich zu CpG-B und CpG-C jedoch sehr schwach ausgeprägt.

- CpG-B (auch: CpG-K), Prototyp: ODN 2006 [Krieg 2002]

Eine Sequenz dieser Klasse liegt einzelsträngig und komplett PTO-modifiziert vor. Sie enthält mindestens ein CpG-Motiv. Die Sequenz des Prototyps ODN 2006 enthält dreifach das im humanen System optimal immunstimulatorische Motiv (5'-GTCGTT-3', [Hartmann und Krieg 2000]). CpG-B fördert das Überleben und die Aktivierung und Ausreifung der PDCs. Es ist ein starkes B-Zell-Stimulans, erzeugt jedoch eine schwache NK-Zell-Aktivierung und wenig IFN- α in der PDC. Durch diese Eigenschaften stellt es ein potentes Vakzine-Adjuvans dar, besonders, wenn eine Induktion der

primären CTL-Immunantwort benötigt wird, wie z. B. in prophylaktischen Impfungen. In diesem Zusammenhang werden auch mehr Antigen-spezifische IFN- γ -produzierende T-Zellen induziert. Als ProMune® (Fa. Coley, Pfizer) befindet es sich bereits in Klinischen Studien der Phase III für die Behandlung von nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom.

- CpG-C, Prototyp: ODN M362

[Hartmann et al. 2003; Marshall et al. 2003; Vollmer et al. 2004]

Diese CpG-Klasse vereint die Effekte von Klasse A und B. Neben einer hohen Induktion von IFN- α in PDCs kommt es zu einer starken B-Zell-Aktivierung. Die Sequenz hat ein 5'-TCGTCG-Ende, ist komplett PTO-modifiziert und enthält ein CpG-reiches Palindrom im Zentrum. Als Actilon® (Fa. Coley) befindet sich ein ODN der Klasse C in Klinischen Studien der Phase I für die Behandlung von Hepatitis C.

1.2.4 Therapeutischer Einsatz von CpG-Oligodesoxynukleotiden

Die Immunantwort, die durch CpG-Motive ausgelöst wird, bietet bislang fünf interessante Ansatzpunkte für einen therapeutischen Einsatz:

- Die immunprotektive Aktivität von CpG wurde im Tierversuch gezeigt, als Mäuse, die zuvor bakterielle oder CpG-DNA injiziert bekommen hatten, resistent gegen Infektionen durch die ursächlichen Bakterien von Anthrax, Listeria oder Tularämia waren. Dieser Effekt gilt ebenfalls für Infektionen von Ebola-, Herpes- oder Zytomegalieviren. Gegen Parasiten wie Leishmanien oder den Malariaerreger wurde ebenfalls eine erhöhte Widerstandsfähigkeit erlangt [Krieg et al. 1998; Zimmermann et al. 1998; Elkins et al. 1999; Klinman et al. 1999; Walker et al. 1999; Ashkar et al. 2003]. Noch andauernde Studien belegen diese immunprotektive Aktivität auch in Bezug auf schwangere, immunsupprimierte und neugeborene Tiere. Einzeln eingesetzt können CpG-ODN durch ihren Wirkmechanismus für eine koordinierte Immunreaktion sorgen und sind damit der Gabe einzelner Zytokine wie IFN- α oder IL-1 überlegen.

- Durch die Induktion einer T_H -1-Antwort mit Produktion von IFN- γ werden Infektionen mit intrazellulären Erregern abgewehrt und allergische Reaktionen verhindert. Diese beruhen auf einem *switch* von einer T_H -1- zu einer T_H -2-gerichteten Immunlage. Kombiniert man also CpG-DNA mit entsprechenden Allergenen, so stimulieren sie eine Antigen-spezifische T_H -1-Antwort und unterdrücken die Entwicklung von T_H -2-vermitteltem allergischen Asthma. Hier wird der größte Erfolg erreicht, wenn das CpG direkt an das Antigen gekoppelt ist. In einer Studie wurde die Wirkung von CpG zur Reduktion einer allergischen Rhinitis, ausgelöst durch Beifuss-Ambrosie (zählt zu den stärksten Allergenen), bereits belegt [Horner und Raz 2002].
- Die Kombination von CpG-DNA mit bestimmten Vakzine-Proteinen kann eine deutliche Verbesserung der adaptiven Immunantwort erreichen, da die Antigen-präsentierenden Zellen aktiviert werden und ein günstiges Zytokin-/Chemokinmilieu geschaffen wird. Indem man die ODN physikalisch an das Antigen bindet, dieses mit Aluminiumsalzen kombiniert oder in Lipidvesikeln oder andere Vehikel inkorporiert, wird eine lokale Verfügbarkeit gewährleistet. Dadurch wird im Tierversuch die spezifische Ig-G-Antwort gegenüber der alleinigen Gabe des Antigens um das 10-1000fache gesteigert [Brazolot Millan et al. 1998; McCluskie und Davis 1998; Moldoveanu et al. 1998; Eastcott et al. 2001; Klinman et al. 2004]. Hierbei wurden Toxoide (z. B. Tetanus), Viren (z. B. Hepatitis B), Bakterien (z. B. Anthrax) und Parasiten (z. B. Leishmanien) getestet. CpG-ODN induzieren neben dem T_H -1-Milieu vorzugsweise die Produktion von IFN- γ durch T-Zellen und NK-Zellen, welche die Sekretion von Ig-G2 α -Antikörpern und Entwicklung von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) ermöglicht. Diese Verbesserung der humoralen und zellulären Immunität wurde trotz verschiedenster Applikationsarten, wie intramuskulär, intranasal, oral oder subkutan, erreicht.

Die Ergebnisse aus den Tiermodellen waren in das humane System übertragbar. In einer Phase-I Doppelblindstudie entwickelten die Probanden nach kombinierter Verabreichung von CpG-ODN und Engerix B® (Hepatitis B Impfstoff) 13-45fach höhere Antikörpertiter sowohl nach erster als auch nach zweiter Immunisierung als bei dem Impfstoff alleine [Klinman et al. 2000b; Halperin et al. 2003]. In einer zweiten Studie wurde CpG-B mit Fluarix® (Influenza Vakzine) kombiniert. Zwar konnte hier die humorale Immunantwort erst bei Probanden mit bereits vorhandenen Influenza-spezifischen Antikörpern signifikant gesteigert werden,

jedoch wurde eine erhöhte IFN- γ -Sekretion innerhalb der PBMCs gemessen. Somit wurde bei gleich bleibender Immunität eine Reduktion der Vakzinedosis ermöglicht [Klinman et al. 2000a]. In keinem Fall wurden unerwünschte Wirkungen beobachtet.

- Der antitumorale Effekt von Infektionen wird, wie bereits beschrieben, schon seit langem beobachtet. Die Immunkaskaden, die CpG-Motive anstoßen, münden in eine Aktivierung von NK-Zellen und CTLs, die bei der Immuntherapie von Tumoren zum Einsatz kommen. Neben der Art des Tumors ist vor allem die CpG-Klasse für einen Erfolg im prophylaktischen oder therapeutischen Einsatz ausschlaggebend. Im Mausmodell zeigten sich unter Therapie mit CpG-DNA eine Regression des Tumorwachstums und sogar eine komplette Remission bei einer nicht unbeträchtlichen Anzahl von Tieren [Carpentier et al. 1999]. Durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses konnte ein erneutes Auftreten des Tumors verhindert werden [Carpentier et al. 2000]. Kombiniert man CpG-ODN mit Wirkstoffen, die den Tumor direkt aufspüren (wie z. B. Rituximab, Rituxan®), so wird deren antitumorale Aktivität noch effektiver, da ihre Wirkung auf einer durch Antikörper vermittelten zellgebundenen Zytotoxizität beruht. Diese wird durch gleichzeitige Verabreichung von CpG-DNA verstärkt [Wooldridge et al. 1997]. Die Entwicklung einer wirksamen Tumorstoffe steht vor der Herausforderung, die Immuntoleranz gegenüber einem Tumorstoff zu brechen und eine spezifische (auch zelluläre) Immunantwort zur Zerstörung der entarteten körpereigenen Zellen zu erreichen. CpG-ODN wären hier aufgrund ihres Wirkungsprofils als Adjuvans prädestiniert [Brunner et al. 2000; Heckelsmiller et al. 2002a; Heckelsmiller et al. 2002b]. Hierzu haben erste klinische Studien auch in unserer Abteilung begonnen.
- Die Gabe von Interferon stellt einen wichtigen Therapieansatz bei Virusinfektionen dar, z. B. chronischer Hepatitis B und C. Auch malignes Melanom, AIDS-bedingtes Kaposi-Sarkom und einige Myelom- und Lymphomarten gehören zu den Indikationsgebieten. Die Wirkstoffe sind rekombinant hergestellte IFN- α 2a (RoferonA®), IFN- α 2b (IntronA®) und IFN- α 1 (Inferax®). Außerdem sind zwei pegylierte Interferone (Pegasys®, PegIntron®) zugelassen, welche durch Polyethylenketten an den IFN-Molekülen signifikant vor Abbau geschützt werden und somit eine deutlich höhere *In-vivo*-Halbwertszeit besitzen. Mit endogenen Induktoren von IFN- α können Therapeutika geschaffen werden, die ein breites Spektrum an körpereigenen Typ-I IFN Isotypen ohne die Gefahr einer

Immunogenität erzeugen. Das Klasse-C ODN Actilon® befindet sich derzeit in Klinischen Studien (Phase II) zu Behandlung von chronischer Hepatitis C.

Auch wenn sich bisher im Tier- wie auch im Humanmodell kein Hinweis auf unerwünschte Wirkungen zeigte, sollten einige Sicherheitsbedenken immer bei dem therapeutischen Einsatz von CpG-ODN berücksichtigt werden. Neben der (erwünschten) Steigerung der Immunogenität von Fremd-Antigenen könnte auch die von Selbst-Antigenen gesteigert und dadurch eine organspezifische oder systemische Autoimmunerkrankung ausgelöst werden. Hohe Dosen bakterieller DNA können im Mausmodell Auto-Antikörper gegen (doppelsträngige) DNA bei ansonsten gesunden Tieren erzeugen [Gilkeson et al. 1995]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass Selbst-DNA/RNA Antikörper-Komplexe potente Liganden für TLR 7 und 9 sind und IFN- α induzieren. Dieser entartete Mechanismus der Selbst-Antigen-Erkennung scheint eine große Rolle bei systemischem Lupus Erythematosus zu spielen, welcher gerade auch mit erhöhten IFN- α -Werten im Serum einhergeht [Barrat et al. 2005]. Von der Induktion von IL-6 und der Förderung des Überlebens aktivierter Lymphozyten durch bakterielle DNA können auch selbst-reaktive Lymphozyten profitieren [Krieg et al. 1995]. Außerdem besteht bei der Applikation von CpG-DNA durch die Induktion hoher Mengen an TNF- α theoretisch die Gefahr eines toxischen Schocks. Jedoch konnten derartige Toxizitätsbedenken weder im Mausmodell noch in den humanen klinischen Studien untermauert werden [Klinman et al. 1997]. In einer kürzlich veröffentlichten Phase I Studie zum Einsatz von CpG-ODN bei Patienten mit rezidivierendem Glioblastom wurden keine schwerwiegenden unerwünschten Nebenwirkungen festgestellt [Carpentier et al. 2006].

Ein wichtiger, den therapeutischen Einsatz von CpG-ODN limitierender Faktor ist die Stabilität und daraus resultierende Bioverfügbarkeit *in vivo*. Das einzige weltweit bisher zugelassene therapeutische ODN ist Formivirsen (Vitravene®). Es wird zur Behandlung der Zytomegalie-Retinitis bei AIDS-Patienten eingesetzt und muss lokal in den Glaskörper injiziert werden, da seine Halbwertszeit sonst zu kurz wäre. Die systemische Stabilität therapeutischer ODN zu erhöhen erweist sich als Herausforderung für die pharmazeutische Technologie.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Der erfolgreiche therapeutische Einsatz von CpG-ODN hängt entscheidend davon ab, wie gut mit diesen eine virale Infektion imitiert und das Immunsystem gezielt in einen Alarmzustand versetzt werden kann. Während das jeweilige immunologische Aktivierungsprofil der drei CpG-Klassen A, B und C bereits weitgehend bekannt ist, sind die sequenzspezifischen und strukturellen Voraussetzungen für diese unterschiedlichen Wirkungen unzureichend verstanden. Eine experimentelle Einschränkung stellt die begrenzte Übertragbarkeit der Struktur-Analysen auf die tatsächlichen Vorgänge im physiologischen Milieu dar. Ohne Kenntnisse der für die differenziellen Wirkprofile maßgeblichen Faktoren kann darauf kein Einfluss genommen werden, um das Spektrum an Einsatzmöglichkeiten für CpG-ODN zu erweitern und zu optimieren. Die therapeutische Anwendung von CpG-ODN wird außerdem bislang durch deren geringe Halbwertszeit *in vivo* eingeschränkt. Eine galenische Hilfe, die systemische Stabilität zu erhöhen, stellt die Bindung der ODN an partikuläre Trägersysteme dar – eine Methode, deren Effektivität in unserer Abteilung bereits gezeigt werden konnte. Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips wären partikuläre Strukturen, die aus immunstimulatorischen Nukleinsäuren aufgebaut sind und keiner weiteren Trägermaterialien bedürfen.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- 1) Die systematische Aufklärung der sequenzspezifischen und strukturbestimmenden Eigenschaften der bereits bekannten CpG-Klassen A und C, um die maßgeblichen Struktur-Wirkungsbeziehungen darzulegen. Dabei soll die Entwicklung geeigneter Methoden zur strukturellen Analyse im physiologischen Milieu im Vordergrund stehen.
- 2) Die Entwicklung Nukleinsäure-basierter, immunstimulatorischer Partikel unter Einsatz der in Teil 1 ermittelten wirksamen Strukturelemente beider CpG-Klassen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte, Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Gernsey, GB)
FACS-Calibur	Fa. Becton Dickinson (BD) (Heidelberg, D)
Gelapparatur Multigel long	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Photokammer	Fa. Kodak (Rochester, NY, USA)
Power Pac 3000 Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, D)
Refrigerationg Circulator KH-4	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Schwenker (Swip-KL2)	Fa. Bühler (Hechingen, D)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Thermocycler RoboCycler	Fa. Stratagene (Heidelberg, D)
Tischzentrifuge	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
UVA-Lampe (2mW, PUVA-2000)	Fa. Waldmann (Villingen-Schwenningen, D)
UV-Crosslinker	Fa. Amersham (Braunschweig, D)
UV-Transilluminator (GelDoc 2000)	Fa. Biorad (München, D)
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Saltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Zentrifuge (5417R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
ZetaPals	Fa. Brookhaven Instruments Corporation (Worcestershire, GB)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well Platten Zellkultur	Fa. Falcon (Heidelberg, D)
96-Well Platten ELISA	Fa. Corning (Corning, USA)
Einmalpipetten (5, 10, 25 ml)	Fa. Greiner (Frickenhausen, D)
Einmalreaktionsgefäße (1,5 ml, 2,2 ml)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Einmalspritzen	Fa. Braun (Melsungen, D)
Filterpapier	Fa. Whatman (Maidstone, UK)
Küvetten (1 ml)	Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D)
Nylonmembran, positiv geladen	Fa. Roche Diagnostics (Penzberg, D)
Objektträger	Fa. Schubert & Weiss (München, D)
Pasteurpipetten	Fa. Brand (Wertheim, D)
PCR Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml)	Fa. Peglab (Erlangen, D)
Pipettenspitzen	Fa. Peglab (Erlangen, D)
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	Fa. Amersham (Braunschweig, D)
Sterilfilter (0,2 µm)	Fa. Schleicher & Schuell (Dassel, D)

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 40%	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Bromphenolblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Cytochalasin D	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethidiumbromid	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACS Clean/Rinse	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACS Flow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Glycerol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Heparin-Natrium	Fa. Braun (Melsungen, D)
HEPES Puffer 1 molar	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
(<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazine- <i>N'</i> -(2-ethansulfonic Acid)	
Kochsalzlösung, NaCl 0,9 %	Fa. Braun (Melsungen, D)
PharMLyse-Reagenz	Fa. BD Pharmingen (Heidelberg, D)
Spermidin	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Sucrose	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
TEMED	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
(<i>N</i> , <i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> -Tetramethylethylen-diamine)	
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypan-blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tris-HCl	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Wortmannin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
(aus <i>Penicillium fusiculosum</i>)	
Xylencyanol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.4 Reagenziensätze

<i>B-Cell Isolation Kit</i>	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, D)
<i>BDCA-4 Cell Isolation Kit</i>	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, D)
<i>BrdU Cell proliferation ELISA</i>	Fa. Roche Diagnostics (Penzberg, D)
<i>CSPD Substrat</i>	Fa. Roche Diagnostics (Penzberg, D)
<i>DIG Wash & Block Buffer Set</i>	Fa. Roche Diagnostics (Penzberg, D)
<i>Human IFN-α ELISA</i>	Fa. Bender MedSystems (Wien, A)
<i>Human IL-6 ELISA</i>	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
<i>Human IL-8 ELISA</i>	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
<i>Human TNF-α ELISA</i>	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)

2.1.5 Materialien für die Zellkultur

<i>Aqua ad inj.</i> (Wasser für Injektionszwecke)	Fa. Braun (Melsungen, D)
<i>Biocoll Separationsmedium</i>	Fa. Biochrom (Berlin, D)
<i>Bovines Serum Albumin (BSA)</i>	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
<i>Fötales Kälberserum (FCS)</i>	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
<i>Humanes AB Serum</i>	Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)
<i>Humanes Serum Albumin (HSA)</i>	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
<i>L-Glutamin</i>	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Penicillin</i>	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
<i>Streptomycin</i>	Fa. PAA (Linz, A)

2.1.6 Zytokine

<i>Interferon-β</i>	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)
--------------------------------------	---

2.1.7 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

2.1.7.1 Medien und Puffer für die Zellkultur

RPMI Vollmedium:

100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
2% autologes Serum
in RPMI 1640 Medium

MACS Puffer:

2 mM EDTA
0,5 Vol% BSA
pH 7,4
in PBS

2.1.7.2 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese

TBE-Puffer:

89 mM Tris- Borat
2 mM EDTA
(pH 8,3) in Aqua dest.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
(pH 8,0) in Aqua dest.

Interstitiell-Puffer:

143 mM NaCl
4 mM KCl
10 mM Tris-HCl
in Aqua ad inj.

Intrazellulär-Puffer:

10 mM NaCl
155 mM KCl
10 mM Tris-HCl
in Aqua ad inj.

Magnesium-Puffer:

10 mM MgCl₂
1 mM Spermidin
10 mM Tris-HCl
(pH 7,25) in Aqua ad inj.

Natrium-Puffer:

100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
(pH 7,25) in Aqua ad inj.

Natives Polyacrylamidgel (16 %):

16 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
0,5 fach TBE
in Aqua dest.

200 µl APS Lsg (10 % in Aqua dest.)
17 µl TEMED

Natives Polyacrylamidgel (physiologisch):

16 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
50 mM HEPES pH 7,5
10 mM MgCl₂
1 mM Spermidin
in Aqua dest.

200 µl APS Lsg (10 % in Aqua dest.)
17 µl TEMED

Laufpuffer:

0,5 fach TBE
in Aqua dest.

Laufpuffer (physiologisch):

50 mM HEPES
10 mM MgCl₂
in Aqua dest.

Auftragspuffer:

5 % Bromphenolblau
 5 % Xylencyanol
 10 % Sucrose
 in Aqua dest.

2.1.8 Antikörper für die Durchflusszytometrische Analyse

Tabelle 2: Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle

Die Antikörper wurden wie in 2.4.4.2 beschrieben verwendet.

Name	Fluoreszenz-kanal	Spezifität	Hersteller
<i>Lineage Cocktail 1</i> (Lin-1)	FITC	CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56	Fa. BD Pharmingen
Anti HLADR	PerCP	HLADR	Fa. BD Pharmingen
Anti CD123	PE	CDw123	Fa. BD Pharmingen
Anti CD11c	APC	BDCA-2	Fa. BD Pharmingen
Anti IgD	FITC	IgD	Fa. BD Pharmingen
Anti CD27	PE	CD27	Fa. BD Pharmingen
Anti CD20	APC	CD20	Fa. BD Pharmingen

2.2 Oligodesoxynukleotide

2.2.1 Zur Zellstimulation eingesetzte Sequenzen

Die in der Zellkultur eingesetzten komplett oder teilweise PTO-modifizierten ODN wurden freundlicherweise von der Firma *Coley Pharmaceutical Group* (Wellesley, USA) zur Verfügung gestellt. Es wurden hochkonzentrierte Stocklösungen (1000 µg/ml) in TE-Puffer hergestellt. Diese wurden dann weiter mit PBS auf eine Konzentration von 400 µg/ml verdünnt und die Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Für die Versuche wurden die ODN in einer Konzentration von 3,2 µg/ml verwendet, wenn es nicht ausdrücklich anders angegeben wird.

Tabelle 3: Oligodesoxynukleotide zur Zellstimulation.

Palindrome sind unterstrichen. Großbuchstaben bezeichnen Phosphorothioat-Bindungen, kleine Buchstaben bezeichnen Phosphodiester-Bindungen am jeweiligen 3'-Ende der Basen

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')
ODN 2216	GGgggacgatcgtcGGGGGg
ODN 2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
ODN M362	TCGT <u>CGTCGTT</u> CGAACGACGTTGAT
ODN M362GC	TGCTGCTGCTTGCAAGCAGCTTGAT
8mer	tcgtcgtt
8mer PTO	TCGTCGTT
8mer GC	tgctgctt
8mer GC PTO	TGCTGCTT

2.2.2 Zur Gelelektrophorese eingesetzte Sequenzen

Ein Teil der für die strukturellen Untersuchungen mittels der Gelelektrophorese eingesetzten ODN wurden von der Firma Metabion (Martinsried, D) nach Auftrag synthetisiert. Diese Sequenzen sind am 5'-Ende über einen Kohlenstoffarm (C-11-Dicer) an ein Digoxigenin-Molekül gebunden. Aufgrund der sehr hohen Sensitivität der Digoxigenin-Detektion wurde im femtomolaren (fmol) Bereich gearbeitet. Die ODN wurden in Wasser für Injektionszwecke (Aqua ad inj.) in einer Konzentration von 100 pmol gelöst (Stock 1), anschließend wurden zwei weitere Verdünnungen hergestellt:

- Stock 1: ODN in Wasser gelöst, Endkonzentration: 100 pmol/ml
- Stock 2: Stock 1 mit Wasser 1:100 verdünnt, Endkonzentration: 1 pmol/ml
- Stock 3: Stock 2 mit Wasser 1:10 verdünnt, Endkonzentration: 100 fmol/ml

Mit den ‚Pal‘ bezeichneten ODN (siehe Tabelle 6) wurde auf gleiche Weise verfahren. ODN 2216, ODN 2006 und ODN M362, die kein Digoxigenin trugen, wurden wie in 2.2.1 angegeben behandelt und mit Ethidiumbromidfärbung detektiert.

Tabelle 4: Zur Gelelektrophorese verwendete Oligodesoxynukleotide

Großbuchstaben bezeichnen Phosphorothioat-Bindungen, kleine Buchstaben bezeichnen Phosphodiester-Bindungen am jeweiligen 3'-Ende der Basen. Mit * gekennzeichnete ODN sind am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert. Palindrome sind unterstrichen. ‚B‘ steht für ‚Anzahl der Basen‘.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	B	Besonderheit
ODN 2216	GGgggacgatcgtcGGGGGg	20	CpG-A
ODN 2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	24	CpG-B
ODN M362	TCGT <u>CGTCGTTCGAACGACGTTGAT</u>	25	CpG-C
ODN M362*	TCGT <u>CGTCGTTCGAACGACGTTGAT</u>	25	DIG-markiert (*)
ODN 2216*	GGgggacgatcgtcGGGGGg	20	DIG-markiert (*)
ODN 2216zP*	GGgggtacgtcgatGGGGGg	20	ODN 2216 ohne Palindrom

Tabelle 5: Zur Gelelektrophorese von ODN M362 verwendete Duplex-Kontrollsequenzen

Mit * gekennzeichnete ODN sind am 5'-Ende Digoxigenin-markiert. Großbuchstaben bezeichnen Phosphorothioat-Bindungen.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	B	Besonderheit
ss/F*	TTCTGACATGCGACTTGACGTGCTG	25	ODN M362 ohne Palindrom
ss/rw*	CAGCACGTCAAGTCGCATGTCAGAA	25	vollständig komplementär zu ‚ss/F‘ ⇒ beide bilden den Duplex ‚ds‘
ss/16rw*	TCCGTCGTCAAGTCGCATGTCTTGT	25	16 komplementäre Basen zu ‚ss/F‘ ⇒ der Duplex mit ‚ss/F‘ (‚ds16‘) simuliert einen M362-Duplex mit freien 5'- und 3'-Enden

Die Duplexvergleiche ‚ds‘ und ‚ds16‘ wurden aus ‚ss/F‘ und ‚ss/rw‘ bzw. ‚ss/F‘ und ‚ss/16rw‘ (Tabelle 5) durch wie in 2.2.4 beschriebenes Erhitzen und Abkühlen auf Raumtemperatur generiert (siehe auch Abbildung 29: Duplexkontrollen für ODN M362, S.93).

Tabelle 6: Zur Gelelektrophorese von ODN M362 verwendete Hairpin-Kontrollsequenzen

Mit * gekennzeichnete ODN sind am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert. Großbuchstaben bezeichnen Phosphorothioat-Bindungen. Verwendete Palindromteile der Sequenz M362 bei den Pal-ODN sind gestrichelt gekennzeichnet, komplementäre Sequenzen bei den Hairpin(Hp)-ODN wurden unterstrichen. ‚B‘ steht für ‚Anzahl der Basen‘.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	B	Besonderheit
Pal-F*	TCGT <u>CGTC</u> CGTTC	12	5'-Ende und halbes Palindrom von M362
Pal-rw	GAACGACG	8	Zu ‚Pal-F‘ komplementäres halbes Palindrom von M362
Pal-rw3	GAACGACGTTGAT	13	Zweite Hälfte der Sequenz von M362, freies 3'-Ende ⇒ Der Duplex mit ‚Pal-F‘ (‚Pal-F+rw3‘) würde einen M362 Hairpin am ehesten simulieren
Pal-frw	GAACGACGACGA	12	Vollständig komplementär zu ‚Pal-F‘ ⇒ Der Duplex mit ‚Pal-F‘ (‚Pal-F+frw‘) hat die Lauflänge eines 12 Basen Doppelstrangs
Hp25/17*	TCGTCTGTTGAGCTCTGAAAGAGCTC	25	Hairpin bildendes ODN: 17 Basen Schleife, 7 komplementäre Basen [Cong et al. 2003]
Hp33/25*	TCGTCTGTTGTGAGCTCTGTGAAACA GAGCTCAC	33	Hairpin bildendes ODN: 25 Basen Schleife, 11 komplementäre Basen [Cong et al. 2003]

Kurze Doppelstränge aus Teilen der M362-Sequenz sollten als Kontrollen der vermutlichen Hairpin-Lauflängen dienen. Hierzu wurden aus den Vergleichs-ODN ‚Pal-F‘ mit jeweils ‚Pal-rw‘, ‚Pal-frw‘ und ‚Pal-rw3‘ (Tabelle 6) die entsprechenden kurzen Doppelstränge durch wie in 2.2.4 beschriebenes Erhitzen und Abkühlen auf Raumtemperatur generiert.

2.2.3 Temperatur-Präinkubation von ODN 2216

Die ODN wurden in Aqua ad inj. oder in dem entsprechenden Puffer gelöst. In einer PCR-Maschine wurden sie zunächst für 5 Minuten (Min) auf 95 °C erhitzt, dann rasch für 2 Minuten auf 4 °C gekühlt und dann für 24 Stunden bei der Endtemperatur von 15 °C, 37 °C oder 60 °C belassen. Entsprechend diesen Endtemperaturen wurden die Konditionen in den Abbildungen mit ‚15°‘, ‚37°‘ oder ‚60°‘ benannt. Die ODN wurden dann direkt verwendet.

Die Versuchsbedingung ‚Positivkontrolle‘ bezeichnet unbehandelte ODN; ‚Negativkontrolle‘ bezeichnet ODN, die 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und dann direkt verwendet wurden, ‚Med.‘ (Mediumkontrolle) steht in allen Experimenten für unstimulierte Zellen.

2.2.4 Temperatur-Präinkubation von ODN M362

Die ODN wurden in 2 ml Eppendorfgefäße mit gummiabgedichtetem Schraubverschluss pipettiert und mit Hilfe eines Schwimmers in ein mit 400 ml Wasser gefülltes Becherglas gesetzt, welches zum Kochen gebracht wurde. Dadurch sollten bereits vorhandene inter- und intramolekulare Bindungen gelöst und somit jedes Experiment durch standardisierte Voraussetzungen vergleichbar gemacht werden. Nach 5 Minuten wurde das Becherglas vom Heizblock genommen und bis zum Abkühlen auf 37 °C oder auf Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Dieser Vorgang, in dem die Zusammenlagerung der durch das Erhitzen generierten Einzelstränge (= *Annealing*) stattfinden sollte, dauerte ungefähr 3 bzw. 4 Stunden. Dann wurden die ODN auf das Gel aufgetragen oder zum Zellversuch verwendet (Diese Bedingungen werden in den Abbildungen als ‚37°‘ bzw. ‚RT‘ bezeichnet). Sollte das *Annealing* noch weiter bis 4 °C erfolgen, so wurde das Wasserglas mit den Proben nach Erreichen der Raumtemperatur in den Kühlschrank gestellt und dort weiter bis auf 4 °C abgekühlt. Diese ODN wurden dann bis zu ihrer Verwendung auf Eis aufbewahrt (Diese Bedingung wurde in den Abbildungen als ‚4°‘ bezeichnet). Durch das langsame Abkühlen auf die gewünschte Temperatur (37 °C, RT, 4 °C) sollte ein optimales

Zusammenlagern der Sequenzen nach Unterschreitung der jeweiligen Schmelztemperatur gefördert werden.

2.3 Polyvalente Linker

2.3.1 Polyvalente Linker - CpG-DNA

Es wurden verschiedene Alkylamingrundgerüste bei Eurogentec S.A. (Seraing, B) mit den jeweiligen Sequenzen an deren 3'-Ende zu Polyvalenten Linkern (PVL) verbunden. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

- Sequenz 1: 5'-TCGTCGTT-3'

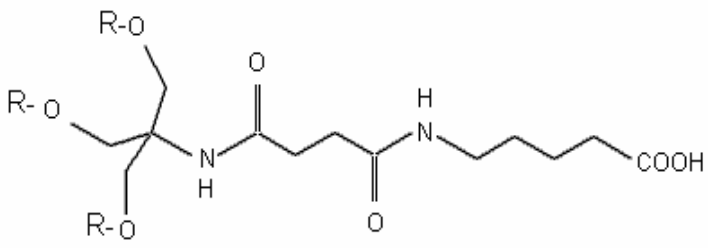
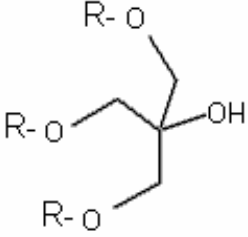
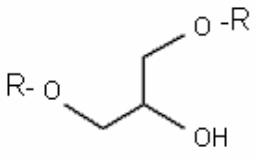
Diese Sequenz enthält das minimal erforderliche immunstimulatorische CpG-Motiv (5'-GTCGTT-3', [Hartmann und Krieg 2000]) und ist in den 5'-Endmotiven von ODN 2006 (Klasse B) und ODN M362 (Klasse C) enthalten.

- Sequenz 2: 5'-TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT-3'

Diese Sequenz entspricht dem Klasse C ODN M362. Das Palindrom ist unterstrichen.

Die PVL wurden in Aqua ad inj. gelöst und in Konzentrationen von 400 µg/ml aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 7: Polyvalente Linker-DNA (schematisiert)

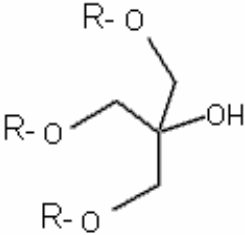
Alkylamingrundgerüst	Bezeichnung
	<p>PVL-A: R = Sequenz 1</p> <p>PVL-B: R = Sequenz 2</p>
	<p>PVL-C: R = Sequenz 1</p> <p>PVL-D: R = Sequenz 2</p>
	<p>PVL-E: R = Sequenz 1</p> <p>PVL-F: R = Sequenz 2</p>

PVL-A und PVL-B bieten durch die Carboxylgruppe eine weitere Bindungsstelle (für z.B. Antigene).

2.3.2 Trivalente Linker - palindromische RNA

Ein trivalentes Alkylamingrundgerüst wurde bei Eurogentec S.A. (Seraing, B) mit der RNA-Sequenz von ODN M362 an deren 3'-Ende zum Polyvalenten Linker (PVL-RNA) verbunden. Die PVL-RNA wurden in Aqua ad inj. gelöst und in Aliquots zu 500 µg/ml aufgeteilt. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 8: Trivalente Linker-RNA (schematisiert)

Alkylamingrundgerüst	RNA-Sequenz (5' → 3')
	<p>UCGU<u>CGUCGUUCGAACGACGUUGAU</u></p> <p>Diese Sequenz ist das RNA-Analogon von ODN M362 (CpG-C).</p> <p>Das Palindrom ist unterstrichen.</p>

2.3.3 Poly-L-Arginine als Transfektionsreagenzien

Die Poly-L-Arginine (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurden in Aqua ad inj. gelöst und zu 200 µg/ml aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden sie bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 9: Zur Transfektion verwendete Poly-L-Arginine

Bezeichnung	Masse (Dalton)	Anzahl Aminosäuren
Poly-R32	ca. 5 500	ca. 32
Poly-R(120-140)	ca. 22 600	ca. 120-140
Poly-R(200-400)	ca. 35 000	ca. 200-400

2.3.3.1 Herstellung des ‚Master-Mixes‘ zur Transfektion

Wenn nicht anders erwähnt, wurden zur Transfektion Poly-R(120-140) verwendet. Es wurden 0,15 µg/ml des jeweiligen Poly-L-Arginins mit 3,2 µg/ml des jeweiligen PVL gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) präinkubiert. Zur Zellstimulation wurden 1,8 µl dieses ‚Master-Mixes‘ pro Well (200 µl) pipettiert.

2.4 Zellulär – immunologische Methoden

2.4.1 Isolation der gewünschten Zellpopulation

2.4.1.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Die Isolation peripherer Blutlymphozyten (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) erfolgte aus dem Vollblut gesunder Probanden, denen bis zu 200 ml Blut abgenommen wurde. In den Spritzen befanden sich bereits 10 µl Heparin je 10 ml Blut, um die Blutgerinnung zu unterbinden. Um die mononukleären Zellen von Blutserum, Erythrozyten und Granulozyten zu trennen, wurde das Blut auf Ficoll geschichtet - ein synthetisches Polysaccharid, welches zu diesem Zweck mit einer Dichte von 1,077 g/ml eingesetzt wird. Während der folgenden Zentrifugation bildet sich ein Dichtegradient aus. Erythrozyten und Granulozyten werden aufgrund ihrer höheren Dichte durch die Ficoll-Phase getragen und sedimentieren. Dieser Prozess wird durch das Ficoll zusätzlich beschleunigt, weil es als hochpolymerer Zucker eine Agglutination der Erythrozyten bewirkt. Die mononukleären Zellen befinden sich aufgrund ihrer Dichte an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Plasma und werden dort als gräulicher Ring sichtbar, wohingegen sich Thrombozyten wegen ihrer höheren Dichte oberhalb der Grenzschicht im Plasma anreichern. Da sich die Dichten teilweise überschneiden, kann eine - wenn auch geringe - Restkontamination der PBMCs mit Granulozyten und Thrombozyten nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Für die PBMC-Isolation wurde 15 ml Raumtemperatur-warme Ficoll-Lösung in konischen 50 ml Röhrchen (*blue caps*) vorgelegt. Das frisch abgenommene Blut wurde in 50 ml *blue caps* 1:2 mit steriler 0,9%iger NaCl-Lsg. verdünnt und dann je 35 ml verdünntes Blut vorsichtig auf die Ficoll-Phase geschichtet, wobei eine Verwirbelung von Blut und Ficoll unbedingt zu vermeiden war. Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt (30 Min, 2000 rpm (*rounds per minute*), Beschleunigung 4, Bremsung 0, 20 °C) wurde der gräuliche PBMC-Ring an der Phasengrenze Ficoll-Plasma sichtbar und konnte vorsichtig abpipettiert werden. Dabei sollte möglichst wenig Ficoll überführt werden, da es eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen hat.

Die aus je zwei *blue caps* gewonnenen PBMCs wurden in einem neuen *blue cap* auf 50 ml mit NaCl aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (15 Min, 1600 rpm, Beschleunigung 4, Bremsung 1, 20 °C). Nun folgten zwei weitere Waschschrte, bei denen die Überstände dekantiert und die Zellpellets aus jeweils zwei *blue caps* in einem Röhrchen zusammenpipettiert und mit NaCl-Lsg. resuspendiert wurden bis schließlich ein Gesamtpellet im letzten *blue cap* übrig blieb (10 Min, 1000 rpm, Beschleunigung 4, Bremsung 4, 4 °C). Schließlich wurden das Pellet in 50 ml NaCl-Lsg. resuspendiert und die Zellen mit Hilfe Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer gezählt. Es wurden nur solche Zellfraktionen weiterverwendet, deren Viabilität über 95 % betrug. Das bedeutet, dass mehr als 95 % aufgrund ihrer intakten Zellmembran den Supravitalfarbstoff Trypanblau ausschlossen und lichtmikroskopisch farblos blieben. Die erwartete Ausbeute an PBMCs betrug je nach Spender im Durchschnitt ca. 10^6 Zellen/ml Vollblut.

2.4.1.2 Plasmazytoide dendritische Zellen

Die Isolation der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) erfolgte mittels magnetischen Zellsortens (MACS = *magnetic-activated cell sorting*) der gewonnenen PBMCs nach dem Protokoll von Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach, D). Das hier verwendete BDCA-4-Kit macht sich zunutze, dass das Oberflächenmolekül BDCA-4 vor allem von PDCs exprimiert wird. Binden spezifische Antikörper, die an eisenhaltige Mikropartikel gekoppelt sind, an diese Oberflächenmoleküle, so können die auf diese Weise markierten PDCs mittels einer paramagnetischen Trennsäule von der übrigen Zellfraktion getrennt werden.

Zunächst wurden die PBMCs mit 50 µl Anti-BDCA-4-Mikrobeads je 100 Mio. Zellen und 50 µl je 100 Mio. Zellen Fc-Block (Fc-Rezeptor blockierendem Agens: die Antikörper anti-CD16 und anti-CD32) in der 3fachen Menge MACS Puffer für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Durch den Fc-Block wurden unspezifische Bindungen des Antikörpers oder anderer Zellen an Fc-Rezeptoren verhindert, die die Ausbeute und Reinheit verfälscht hätten. Die Zellsuspension wurde mit 30 ml MACS Puffer gewaschen (Zentrifugation: 8 Min, 1200 rpm, Beschleunigung 4, Bremsung 4, 4 °C), in 7 ml MACS Puffer resuspendiert und auf eine vorher mit etwas MACS Puffer befeuchtete LS-Säule gegeben (Miltenyi Biotech).

Die Säule wurde in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten (MidiMACS, Bettvolumen: 3 ml) eingebracht. Dadurch wurden alle Zellen, die an die BDCA-4-*Beads* gebunden hatten, mit diesen in der Säulenmatrix zurückgehalten. Der Durchfluss aus dieser ersten Säule wurde für die Isolation von B-Zellen verwendet (siehe 2.4.1.3).

Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt worden war, konnte die betreffende Zellfraktion mittels eines Stempels aus der Säule eluiert werden. Nach einem zweiten Waschschrift wurde diese Fraktion in 2 ml MACS Puffer gelöst und auf eine vorher mit MACS Puffer befeuchtete MS-Säule (Magnet: MiniMACS, Bettvolumen: 1 ml) gegeben. Durch das noch kleinere Bettvolumen der zweiten Säule wurde eine noch höhere Reinheit der Zellpopulation gewonnen. Wiederum konnte die in der Säule retendierte Zellfraktion nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld mittels eines Stempels und 3 ml MACS Puffer eluiert werden. Die Viabilität (> 95 %) und Zellzahl wurde mit der Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer bestimmt.

2.4.1.3 Gesamt B-Zellen (CD19⁺)

Um CD19-positive Zellen (Mischung aus naiven und B-Gedächtnis-Zellen) zu isolieren, wurde der Durchfluss aus der ersten Säule der PDC-Isolation verwendet: Die Fraktion der nicht-BDCA-4 tragenden PBMCs. Nach einem Waschschrift (Zentrifugation: 6 Min, 1300 rpm, Beschleunigung 9, Bremsung 9, 4 °C) wurde das Pellet in 10 µl Anti-CD19-*Microbeads* und 90 µl MACS Puffer je 100 Mio. Zellen resuspendiert und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift konnten die CD19⁺-Zellen mittels einer LS-Säule von der restlichen Zellpopulation analog der bereits beschriebenen PDC-Isolation getrennt werden. Auch hier wurden die Viabilität (> 95 %) und Zellzahl mit der Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer bestimmt.

2.4.2 Herstellung autologen Serums

Um die Kultivierung der Zellen mit einem Minimum spenderfremder Zusätze durchführen zu können, wurde für jedes Experiment autologes Serum des jeweiligen Spenders eingesetzt. Im Rahmen der Blutabnahme für 2.4.1 wurden zusätzlich ca. 10 ml Blut in Serumröhrchen abgenommen und ca. 60 Minuten stehen gelassen, um den Gerinnungsprozess abzuwarten. Serumröhrchen enthalten kleine Silica-Partikel, die diesen Vorgang noch beschleunigen. Nach Zentrifugation (6 Min, 1300 rpm, Beschleunigung 9, Bremsung 9, RT) wurde das Serum abpipettiert und in 2 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Dann wurde es bei 56 °C für 30 Minuten im Heizblock hitzeinaktiviert und anschließend zur sofortigen Herstellung von Kulturmedium verwendet.

2.4.3 Zellkultur

Die Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten in RPMI Vollmedium mit 2 % autologem Serum (2.4.2) kultiviert. Die Zellkultur erfolgte bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 %igem CO₂/Luftgemisch in einem Begasungsbrutschrank.

- PBMCs wurden in den Experimenten stets in der Konzentration 2 Mio./ml eingesetzt. Je Kontrollbedingung wurden Triplikate pipettiert.
- Bei B-Zellen wurde die Konzentration 250 000/ml eingestellt. Je Kontrollbedingung wurden Triplikate pipettiert.
- PDCs wurden zu 125 000/ml verwendet. Es wurden aufgrund der geringen Zellzahlen Unikate angesetzt, falls nicht anders angegeben.

2.4.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

2.4.4.1 Grundprinzip der FACS-Analyse

Die FACS Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) schafft die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotypus zu unterscheiden und zu quantifizieren. Nachdem die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen das entsprechende Oberflächenantigen markiert wurden, werden sie in einem laminaren Flüssigkeitsstrom nacheinander durch einen Laserstrahl geführt. Aufgrund der unterschiedlichen Zelleigenschaften (Form, Größe, Oberflächenmembran und intrazelluläre granuläre Bestandteile) tritt eine Lichtstreuung auf. Diese wird von je einer Linse sowohl in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) als auch rechtwinklig dazu (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert. Dabei wird das Vorwärtsstreulicht wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Anhand dieser Eigenschaften wird ermöglicht, die gewünschte Zellpopulation auszuwählen und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen.

Das Durchflusszytometer ist mit zwei verschiedenen Lasern ausgestattet, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittieren und somit die benutzten Fluorochrome der an die jeweiligen Zellen gebundenen Antikörper zur Fluoreszenz anregen. Ein luftgekühlter Argonlaser emittiert auf der Wellenlänge 488 nm und ein Diodenlaser emittiert Licht der Wellenlänge 635 nm. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und somit zur Anzahl der Oberflächenmoleküle. Die angeregten Fluoreszenzen können durch Filter in maximal vier Farben aufgetrennt werden. Als Fluorochrome wurden Fluoresceinisothiozyanat (FITC, Bandpassfilter: 530 nm), Phycoerythrin (PE, Bandpassfilter: 585 nm), Allophycocyanin (APC, Bandpassfilter: 661 nm) und Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP, Bandpassfilter: 670 nm) verwendet. Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Filter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe teilweise überlagern. Daher muss sie durch Kompensation korrigiert werden, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Teil abgezogen wird, der durch die Überlagerung entsteht.

Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt wird, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. Nun wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in andere Kanäle überstrahlt und dadurch dessen Kompensation desselben ermöglicht. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit einem FACS-Calibur® Gerät durchgeführt.

2.4.4.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit von plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen

Zur Färbung wurden ca. 50 000 Zellen in einem FACS Röhrchen abzentrifugiert (6 Min, 1300 rpm, Beschleunigung 9, Bremsung 9, 4 °C), der Überstand abgenommen und die Zellen resuspendiert. Nun wurden die Zellen 6 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss mit 1-1,5 µl der FITC-, PE-, PerCP- und APC-gekoppelten Antikörper je 50 µl Zellen inkubiert, danach mit PBS einmal gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

- Die Reinheit von PDCs wurde durch Detektion Fluorochrom-markierter Antikörper gegen CD123, HLADR (*human leukocyte antigen* DR; MHC-II), CD11c und Lineage-Cocktail-1 bestimmt. Der Lineage-Cocktail-1 (Lin-1) besteht aus einer Mischung von CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20- und CD56-Antikörpern. Dadurch kann man die plasmazytoiden dendritischen Zellen als Lin-1 negative, HLADR positive, CD11c negative und CD123 positive Zellen klar von den übrigen mononukleären Zellen abgrenzen.
- B-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD20 (Marker für die Reinheit), CD27 (B-Gedächtniszellen: CD27⁺; naive B-Zellen: CD27⁻), Ig-D (naive B-Zellen: Ig-D⁺; negativ für IgD sind B-Gedächtniszellen nach Isotypenwechsel, dann also Ig-G⁺) und HLADR (naive und B-Gedächtniszellen: schwach positiv) gefärbt.

2.4.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

2.4.5.1 Zytokine

Mit Hilfe des ELISA wurden die Zytokine IFN- α , IL-6 und TNF- α in den zellfreien Kulturüberständen quantifiziert. Man bedient sich beim ELISA eines Enzymgekoppelten Antikörpers zur Quantifizierung des an einen *Coating*-Antikörper gebundenen Zytokins. Zunächst werden ELISA-Platten über Nacht mit dem *Coating*-Antikörper beschichtet. Nach einem Waschschrift (Waschpuffer: 0,05 % Tween20 in PBS) werden die Wells mit Assay-Puffer (0,5 % BSA; 0,05 % Tween20 in PBS) gefüllt und 2 Stunden (IFN- α) bzw. 1 Stunde (IL-6, TNF- α) inkubiert.

In dieser Zeit besetzen die BSA Proteine mögliche noch freie Stellen an den Well-Oberflächen und verhindern damit, dass die zu messenden Zytokine unspezifisch binden. Nach einem Waschschrift werden nun die Proben in die Wells pipettiert. Bei Bedarf wurden die Überstände zuvor mit der entsprechenden Menge Medium verdünnt. Zusätzlich wird eine Standardreihe mit bekannter Proteinmenge aufgetragen und je nach verwendetem Protokoll verschieden lang inkubiert (IFN- α : 0 Min; IL-6, TNF- α : 2 Std).

Anschließend werden Detektions-Antikörper hinzugegeben, welche jeweils an ein Enzym (bei IFN- α : Meerrettichperoxidase [HRP]; bei IL-6, TNF- α : Avidin) konjugiert sind. In der folgenden einstündigen Inkubationszeit binden die Zytokine an die *Coating*-Antikörper und werden zusätzlich durch die Detektions-Antikörper gebunden. Aufgrund dieses Aufbaus als Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex wird die Technik auch *Sandwich*-ELISA genannt. Nun werden ungebundene Antikörper durch weitere Waschschriffe entfernt und eine (farblose) Substratlösung zugegeben, welche von dem gebundenen Enzym zu Farbstoff umgesetzt wird. Mit einem ELISA-Reader wird die Farbintensität bestimmt. Da diese proportional zur Proteinkonzentration der Probe ist, kann sie mit Hilfe der Standardreihe genau berechnet werden.

2.4.5.2 Proliferation (BrdU-ELISA)

Der BrdU-ELISA ist eine nicht-radioaktive Methode, die Zellproliferation zu messen, und basiert auf der Inkorporation von BrdU (*5-bromo-2'-desoxyuridine*) während der Mitose. Mit dieser Methode wurde die B-Zellproliferation als Reaktion auf die entsprechenden Stimuli gemessen. Es wurde der *Cell Proliferation* ELISA BrdU (*chemiluminescence*) der Firma Roche®, das entsprechende Protokoll und die im Set vorhandenen Lösungen verwendet. Nachdem die B-Zellen über Nacht ruhen, werden sie am Folgetag stimuliert und 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nun wird in jedes Well 10 µl BrdU hinzugefügt und die Zellen weitere 24 Stunden inkubiert. In dieser Zeit lagern die proliferierenden Zellen das BrdU als Pyrimidin-Analogon anstelle des Thymidins in ihre DNA ein. Nach Dekantieren des Kulturmediums wird FixDenat-Lösung hinzugegeben, die die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Nun fügt man einen Anti-BrdU-Antikörper hinzu. Dieser bindet an das BrdU, das in die DNA der proliferierten Zellen eingelagert ist. Durch ein entsprechendes Substrat gegen den Antikörper kann man diese Komplexe nun chemiluminometrisch detektieren und damit die Anzahl der Zellen berechnen, die proliferiert haben.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Gelelektrophorese

2.5.1.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Elektrophorese bezeichnet die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld; je nach Ladung und Größe geschieht dies in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Ein Netzgerät erzeugt währenddessen konstant Gleichstrom zwischen den Elektroden. Die Geschwindigkeit der Wanderung der Kationen zur Kathode und der Anionen zur Anode hängt von der treibenden Kraft des elektrischen Feldes auf die Ionen und den Reibungs- und elektrostatischen Widerständen zwischen den Verbindungen und dem umgebenden Milieu ab. DNA mit den vielen Phosphatgruppen ist auch bei pH 7,5-8 negativ geladen und wandert so stets zur Anode. Der Laufpuffer dient zur Aufrechterhaltung des richtigen pH-Wertes und leitet durch seine Ionen den weitaus größten Teil des Stromes.

Es gibt 2 Theorien über das Verhalten von Nukleinsäuren im elektrischen Feld. Der Ogston-Sieffekt besagt, dass sie in Lösung eine globuläre Form annehmen, deren Größe sich von dem Radius der theoretisch angenommenen Kugel beschreiben lässt. Je größer dieser also ist, desto häufiger treten Kollisionen mit der Gelmatrix auf, und die Wanderung der Moleküle wird gebremst. Sehr kleine Fragmente werden durch die Porengröße kaum beeinflusst, in diesem Fall verläuft die Trennung schlecht. Sehr große Moleküle dürften nach dieser Theorie jedoch kaum durch das Gel wandern. Die Reptationstheorie hingegen geht davon aus, dass sich die Nukleinsäuren im elektrischen Feld ausrichten und ihre globuläre Form aufgeben. Die Wanderung erfolgt dann mit einer wurm- oder schlangenartigen Bewegung (lateinisch: *reptare* = kriechen) des linearen Moleküls durch die Poren der Gelmatrix. Die Größenselektion erfolgt hier durch die Tatsache, dass längere Moleküle für diese Bewegung mehr Zeit benötigen als kurze. Das tatsächliche Verhalten lässt sich am ehesten aus einer Mischung von beiden beschreiben.

Polyacrylamid ist ein Polymer aus Acrylamidmonomeren und Vernetzer (meist N, N-Bisacrylamid). Die Polymerisation wird radikalisch durch Zugabe von Ammoniumpersulfatlösung und TEMED gestartet. Das gebildete Gel zeichnet sich durch seine gute Auftrennungsfähigkeit ohne Auflösungsverlust im Bereich < 1000 Basen DNA-Länge aus. Durch den Zusatz von Harnstoff ins Gel können die inter- und intramolekularen Bindungen, die sich gerade bei einzelsträngiger DNA leicht bilden, zerstört werden. Dies bezeichnet man als ‚denaturierende‘ Bedingungen.

Mittels einer temperierbaren Gelkammer konnten konstante Temperaturen während des Gellaufs eingestellt werden, indem durch einen inneren Wassertank permanent entsprechend temperiertes Wasser geleitet wurde. Dadurch konnten die Strukturbildungen bei Raumtemperatur mit denen bei 37 °C und 4 °C verglichen werden. Zur weiteren Simulation physiologischer Bedingungen wurde HEPES-Puffer (140 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH 7,1-7,4) als Grundlage für ‚physiologische Gele‘ gewählt. Er zählt zu den Puffern mit den besten Eigenschaften für biologische Untersuchungen und beeinflusst die elektrophoretische Mobilität, indem er Wanderungsverhalten und Auflösung verbessert [Good et al. 1966; Shipman 1969; Liu und Sommer 1998]. Durch Zusatz von Spermidin in das Gel wurde die Existenz biogener Amine simuliert.

2.5.1.2 Prinzip der Detektion von Digoxigenin-markierten Oligodesoxynukleotiden

Das Hapten Digoxigenin ist das Aglykon des Digitalissteroids Digoxin. Es eignet sich sehr gut zur Markierung verschiedener biologischer Moleküle wie DNA, Proteine und Glykoproteine. Die Nachweisreaktion ist kaum störungsanfällig in Hinblick auf endogene Substanzen oder Bindungsstellen, da Digoxigenin natürlicherweise nur in Digitalis vorkommt. Die Digoxigenin(DIG)-markierten Proben werden in einem Enzym-Immunoassay mit Hilfe eines Anti-DIG-Antikörpers nachgewiesen. Die hybridisierte Probe wird mit einem Anti-DIG-Fab-Fragment, das an eine alkalische Phosphatase gebunden ist, detektiert und mit dem Chemilumineszenz-Substrat CSPD visualisiert. Die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD führt zu einer Licht-Emission auf einer maximalen Wellenlänge von 477 nm. Diese kann einen Röntgenfilm in einer Belichtungszeit von 15-30 Minuten belichten. Das Lichtsignal wird mit der Zeit immer stärker und verbleibt für Tage auf der Membran. Da einzelsträngige DNA durch

Ethidiumbromid normalerweise nicht zuverlässig angefärbt werden kann, wurden DIG-markierte ODN in sämtlichen Gelelektrophoresen von ODN M362 verwendet. Im Gegensatz dazu hatten Vorversuche gezeigt, dass der Einzelstrang des ODN 2216 mit Ethidiumbromid anfärbbar sein würde; bei weiteren Experimenten konnte auf die (aufwändigere) DIG-Detektion verzichtet werden. Die durch DIG-Markierung und DIG-Detektion erhaltenen Laufhöhen der ODN waren mit den durch Ethidiumbromid detektierten Bildern vergleichbar.

2.5.1.3 Prinzip der Detektion von DNA durch Ethidiumbromidfärbung

Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid hat die Eigenschaft, in Nukleinsäuren zu interkalieren und dadurch DNA-Fragmente im UV-Licht (302 nm) als Banden sichtbar zu machen.

2.5.1.4 Durchführung der Gelelektrophorese

Nach Herstellung der gewünschten Konzentration Acrylamidlösung wurden unter dem Abzug zügig 200 µl 10%iger Ammoniumpersulfatlösung (in Aqua ad inj.) sowie 17 µl TEMED hinzugegeben und die Lösung rasch zwischen die beiden durch einen Spacer getrennten und mit einem Gummischlauch abgedichteten Glasplatten der Gelapparatur gegossen. Nach ca. 1 Stunde war das Gel auspolymerisiert und konnte nach Entfernen des Dichtungsgummies in die temperierbare Gelkammer gestellt werden. Dann wurde der jeweilige Laufpuffer hinzugefügt und der Vorlauf für ca. 1 Stunde bei 100 V gestartet. Danach wurden die Proben mit dem Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Um ein sauberes Trennungsergebnis zu erreichen wurden die Proben zu Beginn der Elektrophorese mit Hilfe einer niedrigeren Spannung von 50 V am Boden der Taschen angereichert. Anschließend fand der Gellauf bei 200-290 V und der gewünschten Temperatur für ca. 2-3 Stunden statt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur genommen und die ODN detektiert. Die Gelelektrophorese von RNA-enthaltenden PVL musste mit besonders viel Umsicht und unter Verwendung RNase-freier Reagenzien erfolgen, damit die RNA nicht degradiert wurde.

2.5.1.5 Blotting und Detektion Digoxigenin-markierter Oligodesoxynukleotide

Zunächst wurden die Nukleinsäuren aus dem Gel auf eine positiv geladene Membran übertragen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Blotting. Das hier angewandte Verfahren war der Kapillarblot über Nacht, bei dem die DNA mittels der auf den Blotting-Puffer wirkenden Kapillarkräfte durch das Gel und auf die Membran transferiert wird. Die negativ geladenen Nukleinsäuren werden von der positiv geladenen Membran gebunden. Das Auflegen eines Stapels sehr saugfähigen Papiers auf die Membran erzeugt die einwirkenden Kapillarkräfte. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Ein 3 MM Whatmanpapierstreifen in der Breite des zu blottenden Gels wurde auf eine Glasplatte gelegt, wobei seine Enden in Behälter mit Pufferreservoir tauchten. Verwendet wurde 0,25fach konzentrierter TBE-Puffer. Das Polyacrylamidgel wurde aus der Gelkammer vorsichtig auf den mit Puffer getränkten Streifen übertragen. Hierauf wurde die auf die Gelgröße zugeschnittene und mit Puffer getränkte positiv geladene Nylonmembran gelegt. Die nun folgenden mindestens 10 Blätter trockenes Whatmanpapier, viel Saugpapier und eine Glasplatte als Gewicht sorgten für eine gute Ausbildung der Kapillarkräfte von unten nach oben durch Gel und Membran.

Am nächsten Tag wurden die ODN durch *crosslinking* mit UV/B-Licht auf der Membran fixiert. Die Nylonmembran wurde 3-5 Minuten in 75 ml ‚Waschpuffer‘ gewaschen, dann 30 Minuten in 75 ml Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Nun wurde Anti-DIG-Antikörperlösung (1:10 000 in ‚Blockierungspuffer‘ verdünnt) hinzugegeben und weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Anti-DIG-Fab-Fragment durch zweifaches 15minütiges Waschen der Membran mit Waschpuffer entfernt. Nach 5minütigem Äquilibrieren in ‚Detektionspuffer‘ (pH 9,5) wurde die Membran blasenfrei auf eine Folie gelegt, mit 2-3 ml verdünntem CSPD-Substrat (1:100 in ‚Detektionspuffer‘) versehen und die Folie auf die Membran umgeklappt. Nach 10minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Folie an den Seiten zugeklebt und in einer Belichtungsbox fixiert. Der aufgelegte Röntgenfilm wurde je nach Signalstärke 15-30 Minuten belichtet und dann entwickelt.

2.5.1.6 Färbung mit Ethidiumbromid

Das Gel wurde in eine wässrige Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gegeben. Nach 10minütiger Einwirkdauer wurde das Gel 20 Minuten lang in Aqua dest. geschwenkt, um nicht-interkaliertes Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend wurde das Gel bei 302 nm im UV-Transilluminator mit Hilfe einer Digitalkamera mit Orangefilter fotografiert.

2.5.1.7 Auswertung der Gelbilder

Die Auswertung der Gelbilder wurde visuell und mittels der *plotting*-Methode vorgenommen, welche eine Übertragung der verschieden schnellen und unterschiedlich aufgetrennten Banden in Kurvendiagramme ermöglicht. Vereinfacht ausgedrückt wird ein ‚Schnitt‘ durch das Gelfoto erstellt, bei dem der Grauwert auf der Y-Achse aufgetragen wird und die X-Achse dem Schnitt entspricht. Diese Methode bietet eine bessere Möglichkeit, die Gelbanden in ihrer Intensität und Form zu vergleichen. Außerdem wurde dadurch eine quantitative Auswertung der Banden ermöglicht.

2.5.2 Partikelgrößenbestimmung durch Zetapotenzialmessung

2.5.2.1 Grundprinzip

Das Zeta-Potenzial ist ein Maß für die Anziehung oder Abstoßung zwischen Partikeln. Da kleinste Partikel - wie auch Kolloide - (meist negativ) geladene Teilchen sind, ergibt sich ein Potenzialgradient zwischen der Oberfläche und der freien Flüssigkeit. Durch die Oberflächenladung hat das Teilchen ein elektrisches Grundpotenzial, das als Nernst-Potenzial bezeichnet wird. Dieses herrscht an der Phasengrenze zu der sich anlagernden sog. Sternschicht aus Gegenionen. Auf die Sternschicht folgt eine diffuse Schicht aus positiven, vom negativen Partikel angezogenen, aber von der Sternschicht

abgestoßenen Ionen sowie aus negativen Ladungsträgern, die von der Sternschicht angezogen und gleichzeitig vom negativen Kern abgestoßen werden. Die elektrophoretische Beweglichkeit eines Partikels hängt dabei sowohl von der Dielektrizitätskonstanten und der Viskosität der suspendierenden Flüssigkeit als auch von dem elektrischen Potenzial der Grenzschicht zwischen sich bewegendem Teilchen und umgebender Flüssigkeit ab. Dieses Potenzial an der fest-flüssigen Scherfläche bezeichnet man als Zeta-Potenzial. Ein hohes Zeta-Potenzial beschreibt die höhere Tendenz der Partikel, sich gegenseitig abzustoßen und nicht zu aggregieren. Die Suspension wäre in diesem Fall stabil. Es stellt somit den Schlüssel zum Verständnis und zur Steuerung der Dispergiereigenschaften aufgrund elektrostatischer Kräfte dar und gilt als wichtiger Parameter in vielen Industriezweigen, wie Pharmazie, Medizin, Mineralverarbeitung, Keramik, Baustoffanalyse und Wasserbehandlung.

Das Gerät ZetaPals® (*Phase Analysis Light Scattering*) von der Firma BIC (*Brookhaven Instruments Corporation*) misst die Geschwindigkeit der Teilchenbewegung in einem bekannten elektrischen Feld, um hieraus das Zeta-Potenzial zu bestimmen. Dieses wird in den Teilchendurchmesser bei angenommener runder Form umgerechnet. Laserlicht wird von Partikeln, die sich im elektrischen Feld bewegen, gestreut. Mittels eines Referenzstrahls wird im Detektor (*photomultiplier tube*) aus der Streuung auf die elektrophoretische Mobilität geschlossen. Aus der elektrophoretischen Mobilität kann das Zeta-Potenzial und hieraus schließlich die Partikelgröße berechnet werden.

2.5.2.2 Durchführung der Messung

Die ODN wurden in der Konzentration von 1000 µg/ml (= 155 µmolar) in PBS und zwei jeweils 1:2 daraus angefertigten Verdünnungen zu 500 µg/ml (= 77,5 µmolar) und weiter 250 µg/ml (= 38,75 µmolar) vermessen. Es wurden je Probe zehn Messungen durchgeführt und deren Mittelwert bestimmt (Referenzpuffer: PBS, Wellenlänge: 659 nm, Viskosität: 0,890 cP).

2.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse multipler Versuche werden als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) abgebildet wird. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei * $p < 0,05$ angenommen.

2.7 Software

- Die Ergebnisse der FACS-Analyse wurden mit dem Programm ‚CellQuest 4.0‘ (BD Pharmingen, D) ausgewertet.
- Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der experimentellen Ergebnisse erfolgte mit den Programmen ‚Microsoft Excel‘ und ‚Microsoft PowerPoint‘ (*Microsoft Corporation*, USA).
- Die dargestellten Strukturformeln wurden mit dem ‚Strukturformel Editor 3.1‘ (Buchholz-Wengst GbR, D) erstellt.
- Die thermodynamischen Berechnungen wurden mit dem Programm ‚mfold 3.1‘ (*M. Zuker, Rensselaer Polytechnic Institute*, USA) durchgeführt.
- Die Analyse der Gelbilder erfolgte durch die Plotting-Methode mittels ‚ImageJ 1.34S‘ (*National Institute of Health*, USA).

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von CpG-A und CpG-C

Einzelsträngige DNA besitzt sequenzabhängig die Fähigkeit, inter- und intramolekulare Bindungen einzugehen. CpG-A und CpG-C haben aufgrund ihrer Sequenzen die Möglichkeit zu dimerisieren bzw. zu multimerisieren (CpG-A) und sind in der Lage, hohe Mengen IFN- α in PDCs zu induzieren. Im Folgenden wurden beide Klassen strukturell und funktionell untersucht und die Möglichkeiten der Beeinflussung dieser Strukturbildung getestet.

3.1.1 Untersuchung des Klasse A Oligodesoxynukleotids 2216

CpG-A verfügt neben einem Palindrom über Poly-G-Motive am 5'- und 3'-Ende. Diese können zyklische Basenquartette (sog. G-Tetraden) ausbilden, die jeweils aus vier Guaninen bestehen. Stabilisierende Bindungen sind hier Wasserstoffbrückenbindungen (sog. Hoogsteen-Bindungen). Durch mehrere G-Tetraden stabilisiert können sich Strukturen höherer Ordnung bilden [Kerkmann et al. 2005].

3.1.1.1 CpG-A bildet Nanopartikel im Größenbereich von Viren

Zunächst wurde mittels der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) versucht, die Partikel des ODN 2216 abzubilden. Im Gegensatz zum herkömmlichen Lichtmikroskop werden hochenergetische Elektronen benutzt, um ein Objekt bildhaft darzustellen. Die Präparation der zu untersuchenden Proben, welche sehr dünn (0,1-0,3 μm) sein müssen, ist hierbei sehr aufwändig. Da die Wechselwirkungen zwischen Elektronen und DNA im TEM zu gering sind, muss der Kontrast durch Negativfärbung (sog.

negative stain) mit Uranylacetatlösung verbessert werden. Dies könnte jedoch die Strukturbildung beeinflussen und die Ergebnisse verfälschen. Außerdem sind die Aufnahmen nur in einem Vakuum möglich, welches ebenfalls Auswirkungen auf die Struktur DNA-haltiger Proben haben kann. Möglicherweise aus diesen Gründen konnten keine zufriedenstellend interpretierbaren Aufnahmen erzielt werden. Daher wurde zur Bestimmung der Partikelgrößen die Zetapotenzialmessung angewendet (Abbildung 2). Sie bietet den Vorteil, dass bei Raumtemperatur und mit in PBS gelösten ODN gearbeitet werden kann. Die Messung ergab mittlere Partikeldurchmesser von 24 nm bis 40 nm bei Polydispersitäten zwischen 3,87 und 4,09. Die kleinsten gemessenen Partikel waren 15,8 nm, die größten Strukturen waren 66,6 nm groß. Diese größten Partikel wurden jedoch nicht bei der höchsten gemessenen Konzentration gebildet, sondern bei der mittleren Konzentration von 500 µg/ml (= 77,5 µmol), die der in den Aliquots für die Zellversuche vorhandenen Konzentration entsprach (400 µg/ml).

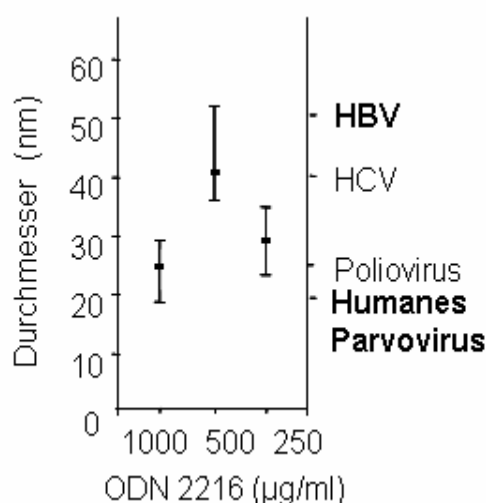


Abbildung 2: Partikelgrößenmessung durch Bestimmung des Zeta-Potenzials

Es wurden je 10 Messungen wie in 2.5.2.2 beschrieben durchgeführt. Gezeigt werden die jeweiligen Mittelwerte der Durchmesser \pm SEM von drei gemessenen ODN-Konzentrationen (1000, 500, 250 µg/ml). Zum Vergleich sind die Größen einiger bekannter Viren aufgetragen. Fettgedruckt sind dsDNA-Viren dargestellt, normalgedruckt sind dsRNA-Viren bezeichnet.

3.1.1.2 Entwicklung der Temperatur-Präinkubationsmethode zur experimentellen Kontrolle der Multimerisierungen

Um die Experimente durch eine standardisierte Behandlung der ODN vergleichbar zu machen, wurden die Präinkubationen in einer PCR-Maschine durchgeführt. Die ODN wurden zunächst für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, damit die vorher durch den Herstellungs- oder Einfriervorgang entstandenen Bindungen gelöst wurden. Der

diesbezügliche Einfluss des Einfrierens war in Vorversuchen bestätigt worden (Abbildung nicht gezeigt). Nach 2 Minuten bei 4 °C wurden die ODN schrittweise auf die Endtemperatur von 15 °C, 37 °C oder 60 °C erhitzt, bei der sie 24 Stunden verblieben. Das Annähern an die Endtemperatur von einer niedrigen Temperatur aus erschien sinnvoll für einen optimalen Partikel Aufbau von kleinen Grundstrukturen zu höhermolekularen Strukturen nach Überschreitung der jeweiligen Schmelztemperaturen. Mit dieser Methode wurde eine wirksame Möglichkeit geschaffen, die Multimerisierungen von ODN 2216 experimentell zu beeinflussen und sowohl durch die Gelelektrophorese optisch nachzuvollziehen als auch im Zellversuch funktionell zu untersuchen.

3.1.1.3 Strukturelle Analyse: CpG-A multimerisiert im physiologischen Milieu

Zunächst wurde durch Gelelektrophorese ermittelt, welche Strukturen CpG-A nach Temperatur-Präinkubation bei intrazellulären (IZ) Na^+/K^+ -Konzentrationen oder interstitiellen (IS) Na^+/K^+ -Konzentrationen bildet. Als Referenzbedingungen wurden ein magnesiumhaltiger Puffer (siehe 2.1.7.2) und die in der Literatur als optimal für die G-Tetradenbildung von Poly-G-DNA angesehene Na^+/K^+ -Konzentration (15:1) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde mit DIG-markierten ODN durchgeführt, um auch den Lauf des möglicherweise noch vorhandenen Einzelstranges detektieren zu können.

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis dieses ersten Experimentes. In Reihe 9 wurde als (Negativ-)Kontrolle die Laufhöhe der Einzelstränge von ODN 2216 dargestellt (c'), indem das ODN direkt vor dem Gelauftrag für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt worden war, um die vorhandenen inter- und intramolekularen Bindungen zu lösen. Da durch ein 16%iges Gel eine gute Trennleistung gewährleistet ist, kann gefolgert werden, dass in den Proben (Reihen 1-8) kein Einzelstrang mehr vorhanden war, weil die Laufhöhen der ODN oberhalb von c' liegen. Ebenfalls waren keine einzelnen Hairpinformationen vorhanden, denn diese würden schneller im Gel laufen und somit unterhalb des Einzelstranges erwartet werden. Laufhöhe b' zeigt bei den Bedingungen 1, 3, 5 und 7 zwei Banden, die vermutlich Duplices und/oder erste, kleinere Partikel darstellen. Diese Banden sind in den Reihen 2, 4, 6 und 8 nicht vorhanden, dort zeigen sich vor allem große, langsam laufende Strukturen, die ab Laufhöhe a' bis zur Geltasche

reichen. Diese Proben waren 24 Stunden bei 37 °C inkubiert worden. Im Gegensatz dazu sind diese großen Strukturen bei 60 °C Präinkubation gelöst worden, die Reihen 1, 3, 5 und 7 zeigen mittelgroße Strukturen in Laufhöhen zwischen ‚a‘ und ‚b‘.

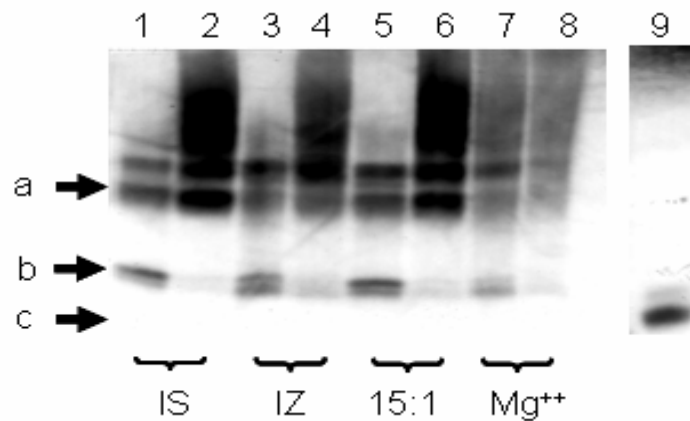


Abbildung 3: Gelelektrophorese des ODN 2216 (physiologische Puffer)

Verglichen wurden die Strukturbildungen in interstitiellem (IS) und intrazellulärem (IZ) Na^+/K^+ -Milieu. Als Referenzbedingungen wurden die in der Literatur als optimal für die G-Tetradenbildung von Poly-G-DNA angesehene Na^+/K^+ -Konzentration (15:1) und ein magnesiumhaltiger Puffer (Mg^{++}) gewählt. Die ODN wurden wie in 2.2.3 beschrieben vorbehandelt: Die ODN in den Reihen 1, 3, 5 und 7 wurden bei 60 °C Endtemperatur präinkubiert, die ODN in den Reihen 2, 4, 6 und 8 wurden bei 37 °C Endtemperatur präinkubiert. In Reihe 9 wurde die ‚Negativkontrolle‘ aufgetragen. Der Gellauf (16 %) erfolgte bei RT und 200 V für 3 Stunden. Es wurde das Protokoll zu DIG-Detektion angewandt. (IS = 143 mM Na^+ / 4 mM K^+ , IZ = 10 mM Na^+ / 155 mM K^+)

Die Tatsache, dass die beiden Banden in Laufhöhe ‚b‘ nur bei den 60 °C-Bedingungen vorhanden sind, die großen Strukturen aber dort fehlen, legt nahe, dass diese Formationen als ‚Grundstrukturen‘ zum Aufbau der größeren Partikel verwendet werden und so in den Reihen 2, 4, 6 und 8 nicht mehr vorhanden sind. Vergleicht man die Reihen 7 und 8 mit den anderen Bedingungen, so fällt auf, dass sich dort weniger klare Banden abzeichnen - der Gellauf erscheint mehr als ‚Schmier‘. Diese Beobachtung deckt sich mit Aussagen der Literatur, wo Magnesiumionen als destabilisierend für den Aufbau von G-Tetraden beschrieben werden [Sen und Gilbert 1992]. Die getrennt laufenden Banden der übrigen Bedingungen belegen, dass sich durchaus definierte Arten Partikel von unterschiedlichen Größenklassen bilden, die sich gelelektrophoretisch auftrennen lassen.

Wichtigstes Ergebnis aus diesem Experiment ist, dass die Banden 1, 3 und 5 sowie 2, 4 und 6 untereinander verglichen ein einheitliches Bild zeigen. Das bedeutet, dass sich die Strukturen bei ODN 2216 unabhängig von hohen Natrium- oder hohen Kaliumionenkonzentrationen bilden. Basierend auf diesem Ergebnis wurden die ODN in allen folgenden Experimenten in PBS ($137 \text{ mM Na}^+ / 2,7 \text{ mM K}^+$) als dem physiologischen Milieu vergleichbarem Puffer verwendet. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist, dass auch die physiologische Temperatur (37°C) förderlich für die Bildung von großen Partikeln ist. Ausserdem ist es möglich gewesen, die Multimerisierungen zu großen Strukturen durch eine höhere Präinkubationstemperatur zu verhindern, ohne dass sich diese während der Elektrophorese wieder zusammenlagern.

3.1.1.4 Identifizierung des zentralen Palindroms als notwendiges Element zum Aufbau größerer Partikel aus G-Tetraden

Der Partikel Aufbau erfolgt unabhängig von den anwesenden Ionen gleich gut, daher musste noch ein zusätzlich stabilisierendes Element vorhanden sein. Da die Sequenz von ODN 2216 zu den Poly-G-Motiven auch ein Palindrom enthält, wurde nun dessen Einfluss auf die Strukturbildung bei 37°C und 60°C untersucht. Es wurde eine Kontrollsequenz von 2216 verwendet (2216zP'), die zwar die gleichen Poly-G-Motive an den Enden und die gleiche Basenhäufigkeit in ihrem Zentrum trug, ohne jedoch ein Palindrom zu haben. Die ODN wurden wie in 2.2.3 beschrieben präinkubiert und auf ein natives 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen (Abbildung 4).

Bei 60°C Präinkubation bilden sich sowohl bei ODN 2216 (Reihe 4) als auch bei ODN 2216zP (Reihe 2) keine größeren Strukturen. Nur die 'Grundstrukturen' (Laufhöhe ,b') sind sichtbar. Bei 37°C bilden sich die größeren Partikel (oberhalb Laufhöhe ,a') nur bei ODN 2216 (Reihe 3) - fehlt das Palindrom, so können trotz der Poly-G-Motive nur Strukturen bis zu einer mittleren Größenordnung aufgebaut werden (Reihe 1, Laufhöhe ,a'). Die 'Grundstrukturen' sind noch vorhanden (Laufhöhe ,b'). Es wird somit eindeutig belegt, dass nur durch die zusätzliche Existenz eines Palindroms im Zentrum von ODN 2216 ein Aufbau größerer Partikel durch G-Tetraden möglich ist.

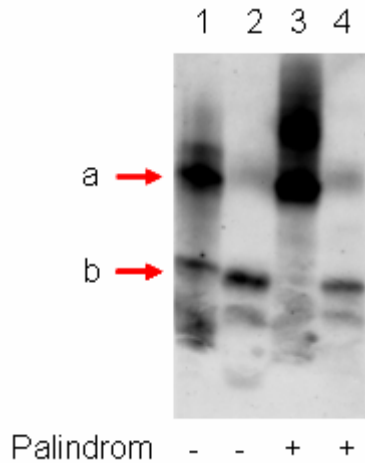


Abbildung 4: Gelelektrophorese der ODN 2216 und ODN 2216zP

Die Kontrollsequenz ODN 2216zP enthält Poly-G-Motive an den Enden und die gleiche Basenhäufigkeit in ihrem Zentrum analog ODN 2216, jedoch kein Palindrom. Die ODN wurden wie in 2.2.3 beschrieben präinkubiert: Die ODN in den Reihen 1 und 3 wurden bei 37 °C Endtemperatur inkubiert, die ODN in den Reihen 2 und 4 wurden bei 60 °C Endtemperatur inkubiert. Alle ODN wurden in 15:1 Na⁺/K⁺-Puffer gelöst. Es wurden je 3,2 µg/ml in ein 10%iges Gel pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei RT und 200 V für 3 Stunden. Es wurde das Protokoll zu DIG-Detektion angewandt.

3.1.1.5 Identifizierung der Natriumionen als wichtiges stabilisierendes Element zum Aufbau der G-Tetraden

Indem nachgewiesen werden konnte, dass die Multimerisierungen des ODN 2216 unabhängig von hohen Natrium- oder Kaliumionenkonzentrationen erfolgen, ergab sich die Frage, wie wichtig die Anwesenheit dieser Ionen generell für die Strukturbildung und die biologische Aktivität ist. Daher wurden die ODN zum Vergleich in Aqua ad inj. und in PBS als physiologisch vergleichbarem Puffer gelöst. Da PBS in unserem Labor üblicherweise zum Lösen von ODN für den Einsatz im Zellversuch verwendet wird, ermöglichte sein Einsatz bei der strukturellen Analyse die Übertragbarkeit deren Ergebnisse in den Zellversuch. Die ODN wurden wie in 2.2.3 beschrieben präinkubiert. Als weitere Bedingung wurde die Endtemperatur von 15 °C hinzugenommen, um festzustellen, ob ein niedrigerer Temperaturbereich die Bildung noch größerer Partikel fördert. Außerdem wurden als ‚Positivkontrolle‘ jeweils ODN 2216 verwendet, die keine Präinkubation durchlaufen hatten.

Zunächst wurden die ODN gelelektrophoretisch analysiert. Das Protokoll wurde dahingehend verfeinert, dass nun auch ein 10%iges Gel eine saubere Auftrennung lieferte und die Detektion mit Ethidiumbromid ermöglicht wurde. Schon die beiden ‚Positivkontrollen‘ in Abbildung 5 zeigen, dass sich große Strukturen nur bilden, wenn die ODN in PBS gelöst wurden, somit also Natriumionen vorhanden sind. Wurden die ODN in Wasser gelöst, sind höher laufende Banden als die des Einzelstranges nur

ganz schwach sichtbar. Diese wenigen Strukturen könnten sich durch eine synthesebedingte Verunreinigung mit Natrium ergeben haben. Werden diese ODN jedoch einem Hitzeschritt unterworfen, so löst dieser alle vorher aufgebauten inter- und intramolekularen Bindungen. Wie die Proben 3, 5 und 7 im Vergleich mit 4, 6 und 8 belegen, können sich nur dann wieder höhermolekulare Strukturen bilden, wenn Natriumionen anwesend sind - ist dies nicht der Fall, so verbleiben die Einzelstränge. Der leichte Schmier oberhalb der Einzelstrangbanden in 4, 6 und 8 entstand detektionsbedingt durch die hohe Konzentration an ODN auf relativ geringem Raum im Gel. Vergleicht man die Bedingungen 2, 4 und 6 miteinander, so wird bestätigt, dass sich bei 60 °C Präinkubation nur mittlere Größenordnungen an Multimeren einstellen, wohingegen bei 37 °C sehr große Partikel favorisiert werden. Interessanterweise erwies sich eine niedrigere Inkubationstemperatur von 15 °C als der physiologischen nicht überlegen. Offenbar wurde die Multimerisierung von ODN 2216 durch eine so niedrige Temperatur thermodynamisch gebremst. Es wurden jedoch deutlich größere Partikel gebildet als es eine Präinkubation bei 60 °C gestattete.

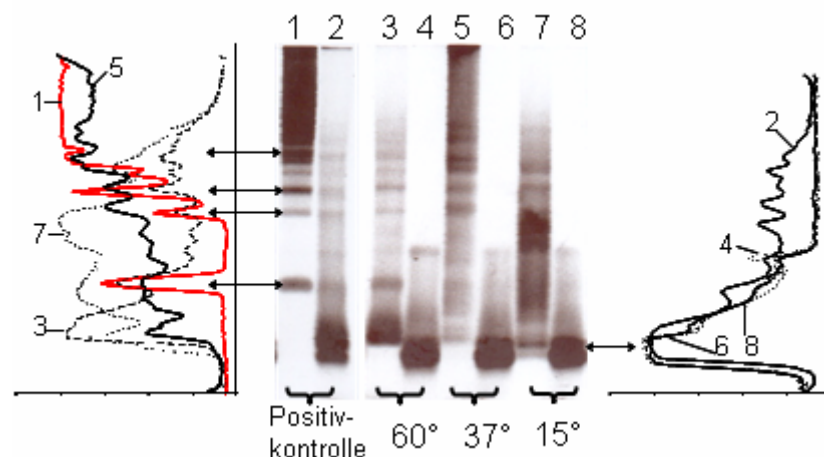


Abbildung 5: Gelelektrophorese des ODN 2216 in PBS oder in Wasser gelöst nach definierten Temperatur-Präinkubationen

Die ODN in Reihe 1, 3, 5 und 7 wurden zuvor in PBS gelöst, die ODN in Reihe 2, 4, 6 und 8 wurden in Aqua ad inj. gelöst. Die ODN 2216 wurden wie in 2.2.3 beschrieben präinkubiert und jeweils 3,2 µg/ml auf das Gel (10 % Polyacrylamid) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei RT und 200 V für 3 Stunden. Die Abbildung zeigt neben dem Gelbild die Plotting-Auswertungen der PBS-Bedingungen (links, Positivkontrolle = Reihe 1 in rot) und der H₂O-Bedingungen (rechts).

Es ist ein wichtiges Ergebnis dieses Experimentes, dass es experimentell durchaus möglich ist, den Partikel Aufbau zu bestimmen. Dabei stellten sich die physiologischen Bedingungen (sowohl die Ionen als auch die Temperatur betreffend) als optimal förderlich heraus.

3.1.1.6 Große Partikel sind die Voraussetzung zur raschen Induktion hoher Mengen von Interferon-alpha in plasmazytoiden dendritischen Zellen

In Anwendung dieser gezielten Beeinflussung der Strukturbildung wurden die Partikel nun an PDCs funktionell untersucht. Wie Abbildung 6 A zeigt, induzieren nur die größeren Partikel, die sich in Anwesenheit von Na^+ durch Präinkubation bei 37 °C und auch noch bei 15 °C bilden, vergleichbar große Mengen IFN- α in PDCs wie die unbehandelte PBS-Positivkontrolle. Die mittleren Größen an Multimeren, die durch Präinkubation bei 60 °C erhalten werden, induzieren eine im Vergleich dazu deutlich verringerte Menge des Zytokins. In Aqua ad inj. gelöst hat die unbehandelte ‚Positivkontrolle‘ eine nur geringere Wirkung, vergleichbar ‚PBS/60 °C‘. Diese Wirkung verliert sich, wenn die ODN durch die Temperaturpräinkubation einem Hitzeschritt ausgesetzt werden. Der verbliebene Effekt beruht vermutlich auf den Einzelsträngen und sehr kleinen Partikeln. Die Bedingung ‚H₂O/60 °C‘ nimmt eine Sonderposition ein, weil nur in diesem Fall die Zytokininduktion von den Befunden der Strukturanalyse abweicht. Die gleiche Beobachtung konnte hinsichtlich der Induktion von TNF- α gemacht werden (Abbildung 6 B). Darüber hinaus konnte der Effekt in gleicher Weise auch für die Induktion von IL-6 nachgewiesen werden (Abbildung nicht gezeigt).

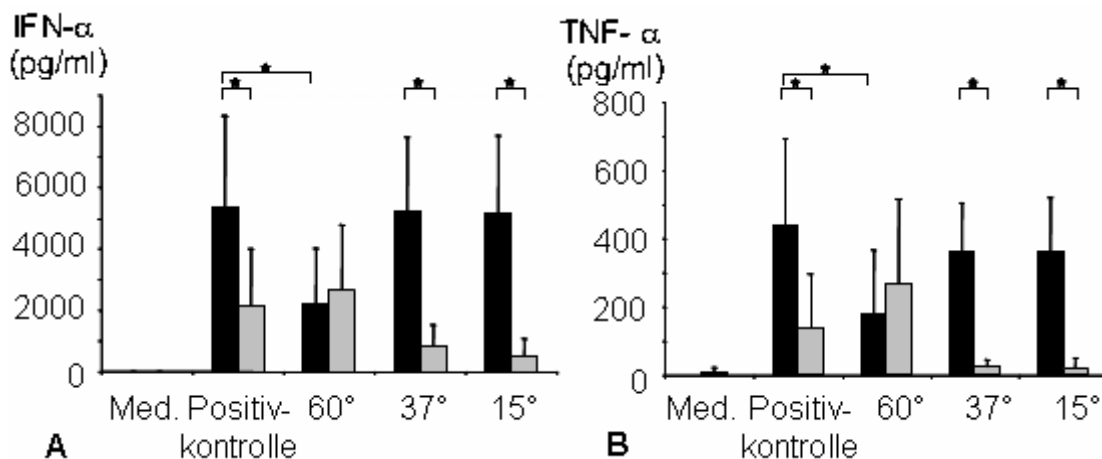


Abbildung 6: Induktion von Interferon-alpha (A) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (B) in PDCs durch verschieden große ODN 2216 Partikel

Isolierte PDCs ($2,5 \times 10^4$ /Well) wurden 24 Stunden mit je $3,2 \mu\text{g/ml}$ der wie in 2.2.3 beschrieben vorbehandelten ODN 2216 inkubiert. Danach wurden in den Überständen die entsprechenden Zytokine mittels ELISA gemessen. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. Schwarze Balken: ODN 2216 in PBS gelöst, graue Balken: ODN 2216 in Aqua ad inj. gelöst; ‚Positivkontrolle‘ bezeichnet ODN ohne Temperatur-Präinkubation, ‚15°‘, ‚37°‘, ‚60°‘ bezeichnen die jeweilige Endtemperatur (in °C) der Temperatur-Präinkubation (2.2.3)

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Folgenden untersucht, inwiefern die unterschiedlich großen Strukturen die Kinetik der Induktion von IFN- α beeinflussen. Dazu wurden in PBS gelöste ODN verwendet. Zusätzlich wurden ODN 2216 nach 10minütigem Erhitzen auf 95 °C direkt eingesetzt, um als ‚Negativkontrolle‘ die Wirkung der Einzelstränge darzustellen. Abbildung 7 beweist, dass nur die großen Strukturen, die sich bei 37 °C Präinkubation bilden ähnlich rasch und in ähnlicher Größenordnung IFN- α induzieren wie die unbehandelte ‚Positivkontrolle‘ (rot). Sie zeigen sich der ‚Positivkontrolle‘ sogar in diesem Experiment leicht überlegen. Die Hauptmenge an IFN- α entsteht bereits in dem Zeitraum 8-16 Stunden nach Stimulation und steigt noch bis zum Zeitpunkt von 24 Stunden an. Danach erfolgt kaum weitere Produktion von IFN- α . Verglichen damit zeigt die ‚Negativkontrolle‘ (die IFN- α Induktion durch Einzelstränge) einen deutlich langsameren und stark verringerten Kurvenanstieg. Auch hier wird eine Art Plateau nach ca. 24 Stunden erreicht, jedoch wird diese Menge IFN- α von den beiden erstgenannten Bedingungen bereits nach ca. 10 Stunden induziert. Die Kurven von ‚60 °C‘ und ‚15 °C‘ verlaufen ähnlich - ein weiteres Indiz für einen Hauptanteil an Einzelsträngen unter diesen Bedingungen. Verglichen mit Abbildung 5 zeigt sich hier eine vollständige Übereinstimmung der funktionellen Daten mit den strukturellen Ergebnissen.

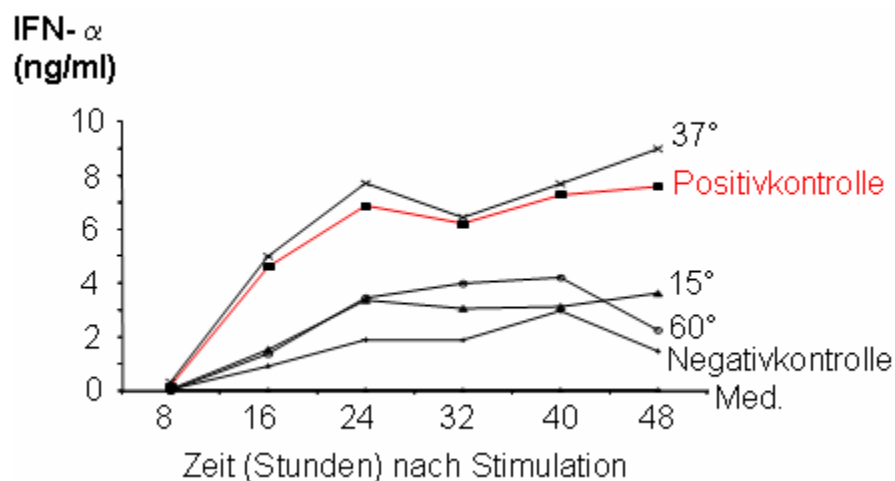


Abbildung 7: Kinetik der Induktion von Interferon-alpha in PBMCs durch ODN 2216 Partikel

Isolierte PBMCs (4×10^5 /Well) wurden mit je 3,2 $\mu\text{g/ml}$ der wie in 2.2.3 beschrieben vorbehandelten ODN 2216 inkubiert. ‚15°‘, ‚37°‘, ‚60°‘ bezeichnen die jeweilige Endtemperatur (in °C) der Temperatur-Präinkubation; ‚Positivkontrolle‘ (rot) = ODN ohne Temperatur-Präinkubation; ‚Negativkontrolle‘ = ODN, die direkt vor dem Versuch für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt worden waren. Alle ODN waren in PBS gelöst. Für jeden Zeitraum wurde eine eigene Bedingung in Triplikaten angesetzt. Nach der jeweils angegebenen Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und die Zytokinkonzentrationen mittels ELISA gemessen.

3.1.1.7 Die Präinkubation von PDCs mit Interferon-beta verstärkt die Induktion von Interferon-alpha durch Einzelstränge

Nun wurde untersucht, ob sich der geringe Effekt der Einzelstränge auf die PDCs durch Präinkubation der Zellen mit IFN- β steigern lässt. Die ODN wurden entweder in PBS oder in Aqua ad inj. gelöst und dann direkt verwendet oder zuvor für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Es wurden also große Partikel mit den Einzelsträngen verglichen. Bei den unbehandelten, in PBS gelösten ODN, die den Maximalstimulus an IFN- α -Induktion darstellen, kann durch das *Vorprimen* keine Steigerung erreicht werden (Abbildung 8). Der Effekt der ODN wird sogar verringert. Dagegen werden die Wirkungen der Einzelstränge deutlich gesteigert. Die graphische Darstellung der durch IFN- β -Vorstimulation erzielten Werte als *fold increase* des Maximalstimulus verdeutlicht dies (Abbildung 8 B). Die im Verhältnis zum Maximalstimulus geringen induzierten Mengen an IFN- α lassen sich durch die IFN- β Präinkubation der Zellen um das 2 bis 4fache steigern.

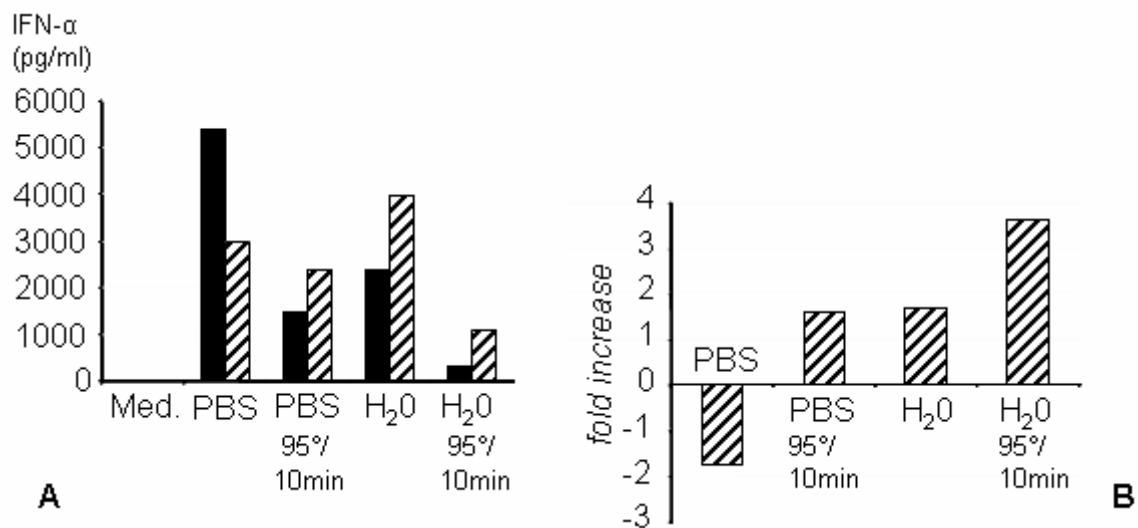


Abbildung 8A: Interferon-beta *Vorpriming*-Effekt auf PDCs

Abbildung 8B: Bezug der durch *Vorprimen* erzielten Messwerte auf den Maximalstimulus (PBS, schwarzer Balken, Abb.8A) als *fold increase*.

Isolierte PDCs ($2,5 \times 10^4$ /Well) wurden 3 Stunden mit 500 U/ml IFN- β präinkubiert (gestreifte Balken) oder ruhen gelassen und direkt verwendet (schwarze Balken). Dann wurden sie mit je 3,2 μ g/ml ODN 2216 für 24 Stunden stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen wurden in den Überständen mittels ELISA gemessen. ‚PBS‘ bzw. ‚H₂O‘ bezeichnen unbehandelte, in PBS bzw. H₂O gelöste ODN 2216; ‚PBS bzw. H₂O/95°C/10min‘ bezeichnen in PBS bzw. H₂O gelöste ODN, die vor dem Versuch 10 Min. lang auf 95 °C erhitzt worden waren (‚Negativkontrolle‘).

3.1.1.8 B-Zellen werden von kleinen Partikeln und Einzelsträngen des ODN 2216 nicht aktiviert

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass die großen Partikel des ODN 2216 für die Induktion hoher Mengen IFN- α in PDCs verantwortlich sind. Durch die Möglichkeit, die Partikelgrößen gezielt beeinflussen zu können, bot sich auch die Gelegenheit, die Wirkung kleiner ODN 2216-Partikel oder der Einzelstränge auf B-Zellen zu ermitteln. Regulär haben ODN der Klasse A, zu denen auch ODN 2216 gehört, keinen direkten Effekt auf diese Zellpopulation. Da die Klasse B stark aktivierend auf B-Zellen wirkt und als monomere CpG-ODN definiert ist, besteht die Möglichkeit, dass Einzelstränge des Klasse A ODN 2216 oder unter Umständen die kleinen Partikel einen stärkeren Effekt auf B-Zellen haben als ihre größeren Analoga. Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse bestätigen diese Erwartungen jedoch nicht: Weder kleine Partikel/Einzelstränge („60°“) noch Einzelstränge („Negativkontrolle“) des ODN 2216 zeigen im Gegensatz zum ebenfalls einzelsträngigen Klasse B ODN 2006 einen Effekt. In weiteren Experimenten konnte auch durch Transfektion der ODN mit Poly-L-Arginin oder durch Vor-Aktivierung der B-Zellen mit IFN- α keine Steigerung erreicht werden (Abbildungen nicht gezeigt).

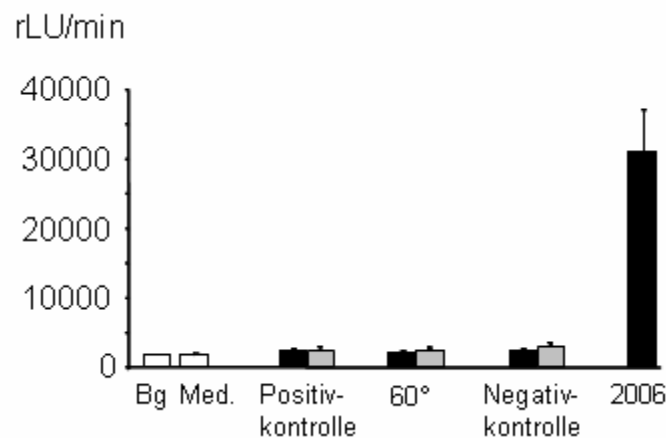


Abbildung 9: ODN 2216 Partikel/ Einzelstränge und B-Zellen

Isolierte Gesamt-B-Zellen (CD19⁺ Zellen, 5 x 10⁴/Well) wurden mit je 3,2 μ g/ml der wie in 2.2.3 beschrieben vorbehandelten („60°“) oder unbehandelten ODN 2216 inkubiert. Es wurde das Protokoll der Zytokinmessung mittels BrdU-ELISA verwendet. Schwarze Balken bezeichnen in PBS gelöste ODN, graue Balken bezeichnen in Aqua ad inj. gelöste ODN. ‚Positivkontrolle‘ = ODN ohne Temperatur-Präinkubation; ‚Negativkontrolle‘ = ODN, die direkt vor dem Versuch für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt worden waren. ‚Bg‘ bezeichnet die *background*-Kontrolle. Es werden die Mittelwerte \pm SEM von zwei Experimenten gezeigt.

3.1.1.9 Strukturelle Analyse: Die Multimere öffnen ihre Bindungen bei $\text{pH} < 6$

Die Bindungen in den G-Tetraden erfolgen über Wasserstoffbrücken (siehe auch Abbildung 27: Modell einer G-Tetrade, gebildet aus vier Guanin-Molekülen mit zentralem monovalenten Kation, S.85). Das macht diese anfällig für Protonierungen wie sie in dem sauren Milieu während der endosomalen Reifung erfolgen könnten. Um diese Vorgänge zu simulieren, wurden durch Zugabe geringer Mengen Salzsäure pH-Werte von 6 bis 4 eingestellt und die ODN für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die folgende gelelektrophoretische Analyse zeigt, dass sich größere Strukturen ab einem $\text{pH} < 6$ langsam lösten bis bei pH 4 nur noch Einzelstränge vorhanden waren (Abbildung 10). Die leiterartigen Banden lassen auf definierte Größenordnungen von Strukturen schließen. Bei pH 5 sind diese Banden im oberen Bereich des Gels verschwunden, dafür im unteren Bereich vorhanden. Bei pH 4 sind diese Banden im unteren Bereich des Gels verschwunden, dafür im oberen Bereich vorhanden.

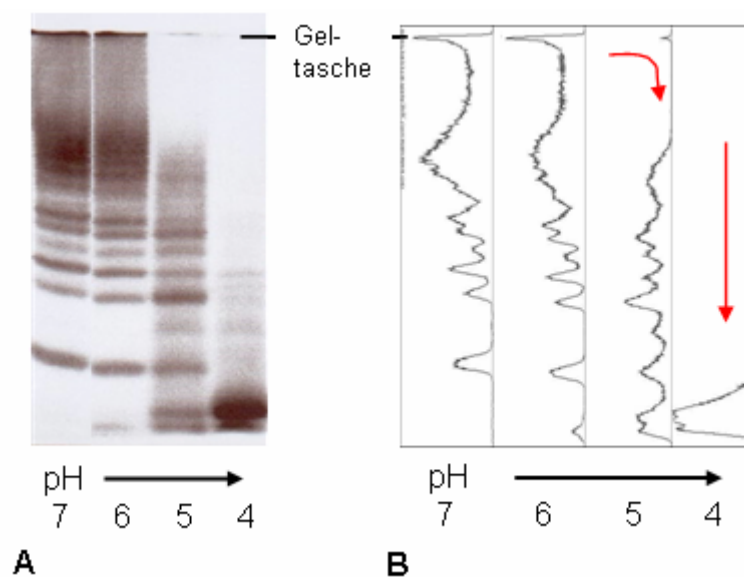


Abbildung 10: Gelelektrophorese des ODN 2216 nach Präinkubation unter verschiedenen pH-Bedingungen

Aliquots des in PBS gelösten ODN 2216 (pH 7) wurden mit geringen Mengen HCl versetzt und die pH-Werte von 6 bis 4 eingestellt. Dann wurden die ODN 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Je 3,2 µg/ml wurden auf ein natives 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei RT und 150 V für 3 Stunden. Die Banden wurden mittels Ethidiumbromidfärbung detektiert. Die Abbildung zeigt das Gelbild (A) und dessen Plot-Auswertung (B).

Die Graphen der Plot-Auswertung ermöglichen eine noch genauere Darstellung der Laufhöhen anhand der verschiedenen Helligkeitswerte. Man kann nachvollziehen, wie die größten Strukturen, die sich in der Geltasche sammeln, bei einem $\text{pH} < 6$

verschwinden und kleine Strukturen bis hin zu den Einzelsträngen mit weiter sinkendem pH entstehen. Dies belegt, wie definiert der Aufbau der größeren Partikel aus einer Art kleinerer ‚Basisstruktur‘ heraus erfolgt, die nun, da die großen Partikel gelöst wurden, wieder auftritt.

3.1.2 Untersuchung des Klasse C Oligodesoxynukleotids M362

Die Sequenz von ODN M362 enthält ein zentrales Palindrom von 16 Basen Länge. Durch die Selbstkomplementarität des Palindroms sind theoretisch mehrere Möglichkeiten gegeben, Duplices wie auch Hairpins neben dem Einzelstrang zu bilden. Ziel der Experimente war, eine Struktur-Wirkungsbeziehung aus der strukturellen Analyse im physiologischen Milieu und der späteren funktionellen Untersuchungen herzuleiten. Dadurch sollten neue Kenntnisse über das Verhalten palindromischer ODN erlangt werden.

3.1.2.1 Strukturelle Analyse bei 4 °C: Die Stabilität der Duplices hängt von den anwesenden Natrium- oder Magnesiumionen ab

Zunächst wurde gelelektrophoretisch untersucht, welche Strukturen auch unter physiologischen Bedingungen stabil sein würden. Zu diesem Zweck wurde ein ‚physiologisches Gel‘ verwendet. Da die Sequenz von ODN M362 ohnehin neben dem zentralen Palindrom einen Überhang von vier nicht-paarenden Basen am 5‘- wie auch von fünf Basen am 3‘-Ende hat und das Digoxigenin-Molekül über einen Undecyl-Arm an das ODN gebunden wurde, konnte eine Beeinflussung der möglichen Strukturbildungen durch die DIG-Markierung ausgeschlossen werden. Zunächst wurde die Strukturbildung bei 4 °C und 37 °C unter verschiedenen Pufferbedingungen untersucht. Es wurde ein Natrium-Puffer gegenüber einem Magnesium-Puffer getestet (siehe 2.1.7.2.). Die Ergebnisse werden in Abbildung 11 A (Gellauf bei 4 °C) und Abbildung 11 B (Gellauf bei 37 °C) dargestellt. Um die Laufhöhe der Duplices zu simulieren, wurden dsODN mit 25 Basen Länge und dem gleichen Basenanteil von ODN M362 eingesetzt (‚ds‘, Reihen 1 und 2; Sequenz in Tabelle 5). Vorversuche hatten ergeben, dass auf gleiche Häufigkeit der Purin- oder Pyrimidinbasen bei den

Kontrollsequenzen im Vergleich zu ODN M362 zu achten war, da die unterschiedlichen Größenverhältnisse der Basen sonst zu unterschiedlichen Laufhöhen trotz gleicher Basenanzahl führen. Außerdem wurde ein Einzelstrang-ODN (,ss/F', Reihe 3; Sequenz in Tabelle 5) aufgetragen, welches bei gleicher Häufigkeit der Purin- und Pyrimidinbasen wie ODN M362 kein Palindrom besaß.

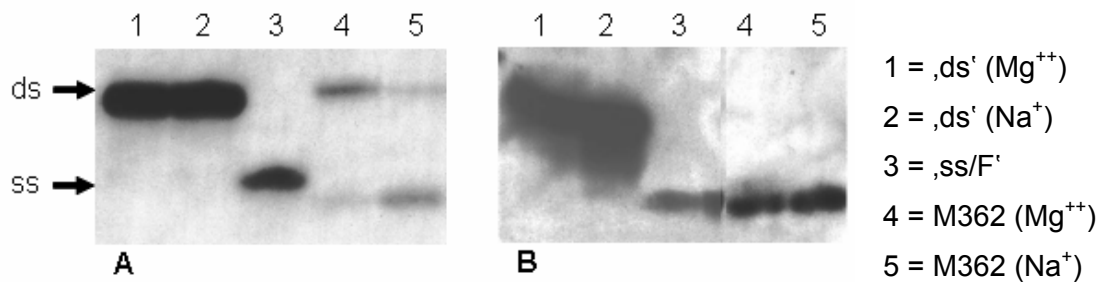


Abbildung 11: Gelelektrophorese von ODN M362 bei 4 °C (A) und 37 °C (B)

Die Proben wurden wie in 2.2.4 beschrieben vorbehandelt und aus dem Wasserbad 37 °C oder aus dem Eis auf ein 16%iges ,physiologisches Gel' aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei den angegebenen Temperaturen für 3 Stunden bei 290 V. Es wurde das Protokoll zur DIG-Detektion verwendet. Die Reihen 1, 2 (,ds') enthalten Duplexkontrollen mit 25 Basen Länge und dem gleichen Basenanteil von ODN M362; Reihe 3 (,ss/F') zeigt den Lauf der Einzelstrang-Kontrollsequenz (gleiche Häufigkeit der Purin- und Pyrimidinbasen wie ODN M362, jedoch kein Palindrom); die Reihen 1 und 4 enthalten ODN, die mit Mg⁺⁺-Puffer versetzt wurden, in den Reihen 2 und 5 sind ODN, die mit Na⁺-Puffer präinkubiert wurden.

Bei 4 °C zeigt sich bei in Na⁺-Puffer präinkubierten ODN M362 (Reihe 5, Abbildung 11 A) eine stärkere Tendenz zum Monomer bei sehr schwachem Signal des Doppelstrangs, während bei Mg⁺⁺-Anwesenheit (Reihe 4, Abbildung 11 A) eine weitaus deutlichere Bildung von Duplexformationen erfolgt. Das relativ schwache Signal im Vergleich zu den Kontrollen hängt mit der Stärke der DIG-Markierung am jeweiligen ODN und der Auftragsmenge zusammen - eine quantitative Auswertung ist also nur im Vergleich mit sich selbst möglich. Abbildung 11 B zeigt, dass unabhängig von dem jeweiligen Puffer keine Doppelstränge mehr vorhanden sind, wenn die Temperatur-Präinkubation nur bis 37 °C durchgeführt wird (Reihe 4 und 5).

3.1.2.2 Strukturelle Analyse bei 37°C: Weder Duplices noch Hairpins sind im physiologischen Milieu stabil

Um genauer zu untersuchen, unter welchen Bedingungen sich Duplices stabil ausbilden und ob diese bei 37 °C überhaupt zu stabilisieren sind, wurden die Experimente mit weiteren Kontroll-ODN wiederholt. Gelläufe bei 4 °C (Abbildung 12 A und C), welche die möglichen Strukturen zeigen sollten, wurden Gelläufen bei 37 °C (Abbildung 12 B und D) gegenüber gestellt, welche nur die im physiologischen Temperaturmilieu stabilen Strukturen darstellten. Verglichen wurde unbehandeltes ODN M362 (Reihe 6, ‚unbehandelt‘) mit einem Aliquot, welches die beschriebene Temperaturpräinkubation bis 4 °C durchlaufen hatte (Reihe 5, ‚95°-4 °C‘) und einer Probe ODN M362, die kurz vor dem Gelauftrag auf 95 °C erhitzt worden war (Reihe 4, ‚95 °C‘). Da zwischen dem eigentlichen Einzelstrangvergleich ‚ss/F‘ und dem ODN M362-Einzelstrang in Vorversuchen immer eine leichte Retardierung im Gel bestand, sollte die auf 95 °C erhitzte Probe ODN M362 nochmals die korrekte Laufhöhe des Einzelstranges wiedergeben. Um den Lauf des ODN M362-Doppelstranges optimal zu simulieren wurden Duplex-ODN verwendet, welche 16 zentrale, paarende Basen und überhängende, freie 5′- und 3′-Enden analog des palindromischen ODN M362 trugen (‚ds16‘; siehe auch 2.2.2 und Abbildung 29).

Wie erwartet zeigt sich bei 4°C eine fast ausschließliche Ausbildung von Doppelsträngen. In Anwesenheit von Na⁺ und bei 37 °C sind diese Banden in den Reihen 4-6 verschwunden (in der Abbildung durch einen Kreis gekennzeichnet). Die Duplices von M362 wurden ebenso wie ‚ds16‘ durch Mg⁺⁺ bei 37 °C stabilisiert (Reihen 5 und 6, Abbildung 12 B). Die Verbesserung dieser Stabilität im Vergleich zu den Ergebnissen von Abbildung 11 wurde offensichtlich vor allem durch die Temperatur-Präinkubation bis 4 °C erreicht. Die Kontrolle ‚ds16‘ zeigte zwar ähnliche Tendenzen bezüglich der Na⁺-und Mg⁺⁺-Einflüsse, jedoch waren bei 4 °C und bei 37 °C gleiche Mengen Doppelstrang stabil.

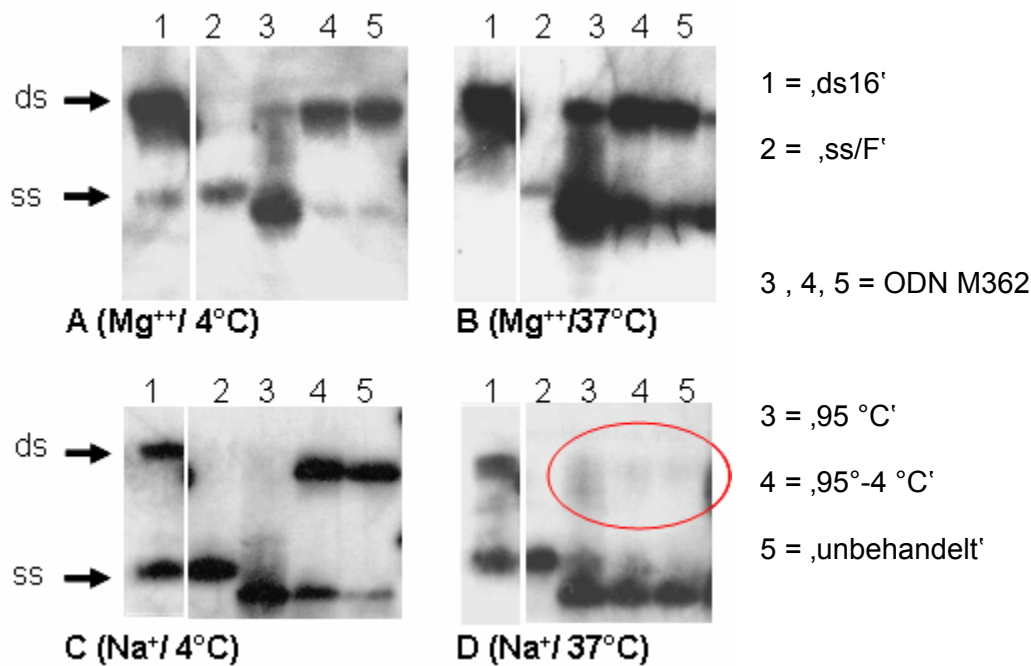


Abbildung 12: Gelelektrophorese von M362 bei 4 °C (A, C) und 37 °C (B, D) / ODN M362 gelöst in Magnesium-Puffer (A, B) und Natrium-Puffer (C, D)

Die Proben wurden auf ein 16%iges ,physiologisches Gel' gegeben, der Gellauf erfolgte bei den angegebenen Temperaturen und 290 V für 3 Stunden. Die Detektion erfolgte nach dem DIG-Protokoll. Reihe 1 zeigt den Lauf einer Duplex-Kontrolle, die 16 zentrale, paarende Basen und überhängende, freie 5'- und 3'-Enden analog des palindromischen ODN M362 trägt (,ds16'); Reihe 2 zeigt den Lauf einer Einzelstrang-Kontrolle, die bei gleicher Häufigkeit der Purin- und Pyrimidinbasen wie ODN M362 kein Palindrom besitzt; die Reihen 3, 4 zeigen den Lauf von ODN M362 nach entsprechenden Temperatur-Präinkubationen wie in 2.2.4 beschrieben; Reihe 5 zeigt den Lauf von unbehandelten ODN M362.

Um einen Hinweis zu erhalten, auf welche Höhe mögliche Hairpins laufen würden, wurde das Experiment mit den entsprechenden Hairpin-Kontrollen (Tabelle 6) wiederholt. Ein Hairpin von ODN M362 hätte bestenfalls 6 paarende Basen, da man 3-4 Basen des Palindroms für die Schleife herausrechnen muss. Kurze Doppelstränge aus Teilen der M362-Sequenz sollten die Laufhöhen simulieren. Da nur eine Teilsequenz DIG-markiert war (,Pal-F'), konnte außerdem die grundsätzliche Bildung dieser kurzen Duplices durch die dann entstandene Retardierung im Gel überprüft werden. Die Kontrolle ,Pal(F+rw3')' würde einen Hairpin von ODN M362 am besten simulieren, da hier die beiden freien 5'-bzw 3'-Enden neben dem kurzen Doppelstrang berücksichtigt und nur die Loop-Schleife vernachlässigt wurde. Zusätzlich sollten ,Hp 33/25' und ,Hp 25/17' ein allgemeines Indiz geben, wie ein Hairpin im Vergleich mit seinem Einzel- und Doppelstrang läuft bzw. ob sich dieser überhaupt unter diesen Versuchsbedingungen bildet.

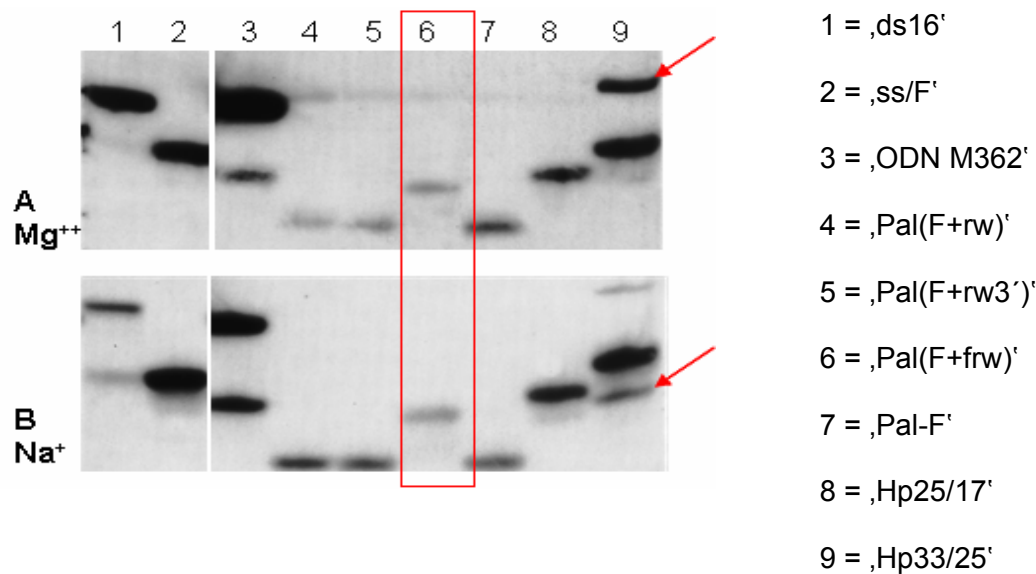


Abbildung 13: Gelelektrophorese von M362 und Hairpin-Kontrollen bei 4 °C und Magnesium-Puffer (A) oder Natrium-Puffer (B)

Die ODN wurden wie in 2.2.4 beschrieben präinkubiert. Dann wurden sie auf ein 16%iges ,physiologisches Gel' aufgetragen, der Gellauf erfolgte bei 4 °C und 250 V für 3 Stunden. Die Detektion erfolgte nach dem Protokoll für DIG-Detektion. Reihe 3 zeigt den Lauf von ODN M362; die Besonderheiten der in den Reihen 1, 2, 4-9 aufgetragenen Kontrollen sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Abbildung 13 zeigt, dass nur die längste Palindrom-Kontrolle (Reihe 6) zusammengelagert und im Gel verglichen mit dem zugehörigen Einzelstrang (,Pal-F', Reihe 7) retardiert ist. Die unterste Bande des ODN M362 befindet sich minimal oberhalb dieses 12 Basen-Doppelstranges. Ein Hairpin von ODN M362 hätte unterhalb dieser Kontrolle laufen müssen; eine sichere Unterscheidung ist anhand der sehr nahen Laufhöhen jedoch schwer möglich. Weitere Hinweise geben die verwendeten Hairpin-ODN. Das längere ODN ,Hp33/25' (Reihe 9) zeigt unter Na⁺-gepufferten Bedingungen (Abbildung 13 B) drei Banden, die aufgrund ihrer Laufhöhe verglichen mit den anderen Kontrollen als Doppelstrang (schwaches Signal oben), Einzelstrang (starkes Signal in der Mitte) und Hairpin (schwaches Signal unten) interpretiert werden. Bei Anwesenheit von Mg⁺⁺ (Abbildung 13 A) wird vermehrt Doppelstrang gebildet, die Hairpin Bande ist unten nur noch sehr schwach zu erkennen. Das kürzere ODN ,Hp25/17' (Reihe 8) bildet unter beiden Bedingungen keinen Doppelstrang und bei Gegenwart von Na⁺ nur sehr schwach einen Hairpin. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für die Ausbildung und Stabilisierung von Hairpins selbst bei 4 °C eine größere Länge der ODN (hier 33 Basen) und Anzahl komplementärer Basen (hier 11 Basen) nötig sind. Aufgrund der hier geschilderten Ergebnisse kann nicht davon ausgegangen werden, dass Duplices oder Hairpins von ODN M362 im physiologischen Milieu stabil sind.

3.1.2.3 Übertragung der Ergebnisse der strukturellen Analyse auf den Zellversuch

Basierend auf den Ergebnissen der strukturellen Analyse wurde nun untersucht, ob der Einzelstrang von M362 den Hauptanteil an der Wirkung besitzt. Die ODN werden üblicherweise in unserem Labor in PBS gelöst, daher sind 137 mM Na⁺ anwesend. Es sollte ein unbehandeltes Aliquot („Positivkontrolle“) mit dem Einzelstrang („95°C“) verglichen werden. Weitere Kontrollbedingungen waren ODN, die das in 2.2.4 beschriebene *Annealing* bis 4 °C („4 °C“) durchlaufen hatten. Diese Versuchsansätze wurden an PBMCs und an B-Zellen (CD19⁺ = naive und B-Gedächtniszellen) getestet.

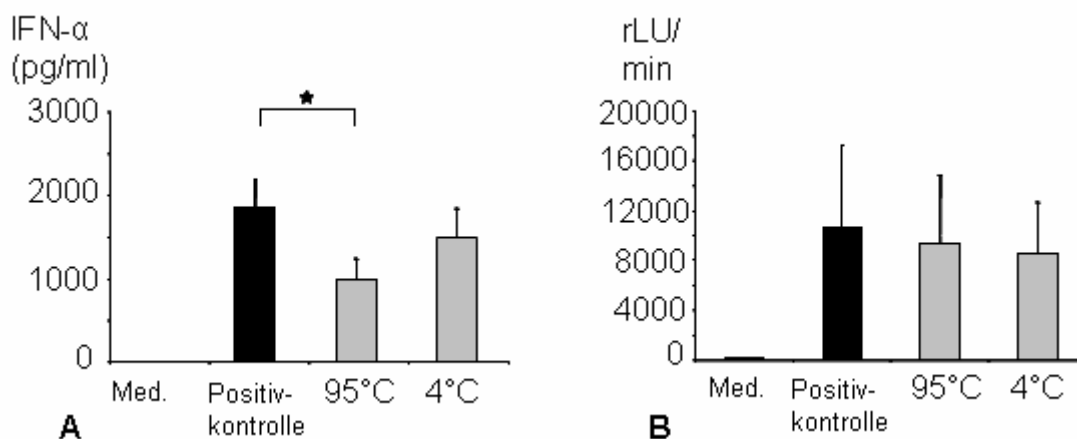


Abbildung 14: Wirkungen des ODN M362 auf PBMCs (A) oder B-Zellen (B)

PBMCs (4×10^5 /Well) oder isolierte B-Zellen (CD19⁺ Zellen, 5×10^4 /Well) wurden mit je 3,2 µg/ml der wie in 2.2.4 beschrieben vorbehandelten (graue Balken) oder unbehandelten (schwarzer Balken; „Positivkontrolle“) ODN M362 für 24 Stunden inkubiert. „4“ bezeichnet Aliquots von ODN M362, die die beschriebene Temperatur-Präinkubation bis 4°C durchlaufen hatten; „95°C“ bezeichnet Aliquots von ODN M362, die 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt worden waren. Dann wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA bei den PBMCs die Zytokinmenge gemessen, bei den B-Zellen die Proliferation bestimmt. Es werden die Mittelwerte \pm SEM von 3 (A) bzw. 2 (B) unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die in Abbildung 14 gezeigten Ergebnisse belegen unterschiedliche Wirkungen der Kontrollbedingungen auf PBMCs. In „95°C“ sind keine Sekundärstrukturen vorhanden, diese Bedingung zeigt eine um ca. 50 % reduzierte Induktion von IFN-α in PBMCs. Die ODN, welchen durch *Annealing* bis 4 °C ein optimales Zusammenlagern ihrer Duplexanteile ermöglicht wurde, induzieren vergleichbar viel IFN-α wie die „Positivkontrolle“. Im Gegensatz dazu haben alle ODN eine ähnlich starke Wirkung auf die B-Zellen (Abbildung 14 B). Man kann also folgern, dass nicht ausschließlich der Einzelstrang für eine Wirkung auf die PDCs, welche die Hauptproduzenten des IFN-α in PBMCs darstellen, verantwortlich ist und dass bei der B-Zellerkennung des Klasse-C ODN eine Sekundärstruktur nicht wichtig ist.

3.2 Design immunstimulatorischer Partikel unter Einsatz wirksamer Strukturelemente von CpG-A und CpG-C

Zentraler Ausgangspunkt zur Entwicklung immunstimulatorischer Partikel waren die Gemeinsamkeiten der CpG-Klassen A und C: die Existenz eines Palindroms innerhalb ihrer Sequenz, die Fähigkeit zu aggregieren und die hohe Induktion von IFN- α in PDCs. Vorteilhaft erschien es, die Hoogsteen-Bindungen der G-Tertraden der Klasse A ODN zum Partikel Aufbau durch kovalente Bindungen zu ersetzen, um die in 3.1 gezeigten Einflüsse von Umgebungstemperatur und Ionenmilieu zu reduzieren. Die einen Strukturaufbau ermöglichende und stabilisierende Wirkung einer Palindromsequenz sollte weiterhin genutzt werden. Aus diesem Grund wurden in Kooperation mit Prof. Rosenberg (Prag) bi- und trivalente Alkylamingrundgerüste entwickelt (Tabelle 7). Diese ermöglichen die Verknüpfung von zwei oder drei palindromischen Nukleinsäuren an deren 3'-Enden.

3.2.1 Polyvalente Linker - palindromische CpG-DNA

Aufgrund seines interessanten Aktivierungsprofils fiel die Wahl auf das Palindrom-ODN der Klasse C (Sequenz 2, ODN M362). Als nicht-palindromische Kontrollsequenz wurde 5'-TCGTCGTT-3' (Sequenz 1) gewählt. Dieses enthält das optimale humane Motiv (5'-GTCGTT-3'; [Hartmann und Krieg 2000]) und ist im 5'-Endmotiv von ODN M362 und dreifach in der Sequenz von ODN 2006 enthalten.

Zusätzlich zu den bi- und trivalenten Grundgerüsten wurde ein Alkylamingrundgerüst entwickelt, welches ergänzend zu den dreifach gebundenen CpG-Sequenzen mittels einer Carboxylgruppe die Möglichkeit bietet, ein Antigen zu binden (PVL-A, PVL-B; siehe auch Tabelle 7, S. 31). Dies könnte in Hinblick auf die spätere Entwicklung von Vakzinepartikeln interessant sein, welche die Koadministration von Antigen und Adjuvans (CpG) in direkter räumlicher Nähe ermöglichen. Im Folgenden soll jedoch der Schwerpunkt auf den strukturellen Untersuchungen als Basis für diese mögliche Weiterentwicklung liegen.

3.2.1.1 Strukturelle Analyse

Es ist zu erwarten, dass bei den Linkern, die Sequenz 2 enthalten, höhermolekulare Strukturen ausgebildet werden. Hier bieten die trivalenten Linker (PVL-B, PVL-D) im Gegensatz zu dem bivalenten Linker (PVL-F) zusätzlich die Möglichkeit, dreidimensionale Strukturen auszubilden. Die Polyvalenten Linker (PVL), die nur die kurze Sequenz 1 (5'-TCGTCGTT-3') tragen, haben weniger paarende Basen zur Bildung von Bindungen zur Verfügung, es ist also zu erwarten, dass sie kaum oder gar keine Partikel bilden. Verglichen wurden die Laufhöhen der PVL mit den ODN 2006 (24mer Einzelstrang) und ODN 2216 (Abbildung 15). Die PVL-A, -C und -E (Reihe 1, 3 und 5) bilden erwartungsgemäß keine großen Strukturen. Dahingegen formieren sich bei PVL-B, -D und -F (Reihe 2, 4 und 6) größere Partikel, die im Gel deutlich retardiert werden. Bei PVL-B und -D sind diese so groß, dass sie zum größten Teil in der Geltasche verbleiben und kaum im Gel wandern. Vergleicht man beide Gelläufe mittels der Plotting-Methode, werden leichte Unterschiede sichtbar. Abgesehen von einer schnell laufenden Bande im unteren Gelbereich zeigt PVL-B mehr Strukturen mittlerer Größenordnung im oberen Bereich des Gels als PVL-D. PVL-F (Reihe 6) bildet Strukturen, die in ähnliche Laufhöhe wie ODN 2216 wandern und ein trotz des unterschiedlichen strukturellen Aufbaus sehr ähnliches Bild auf dem Gel ergeben.

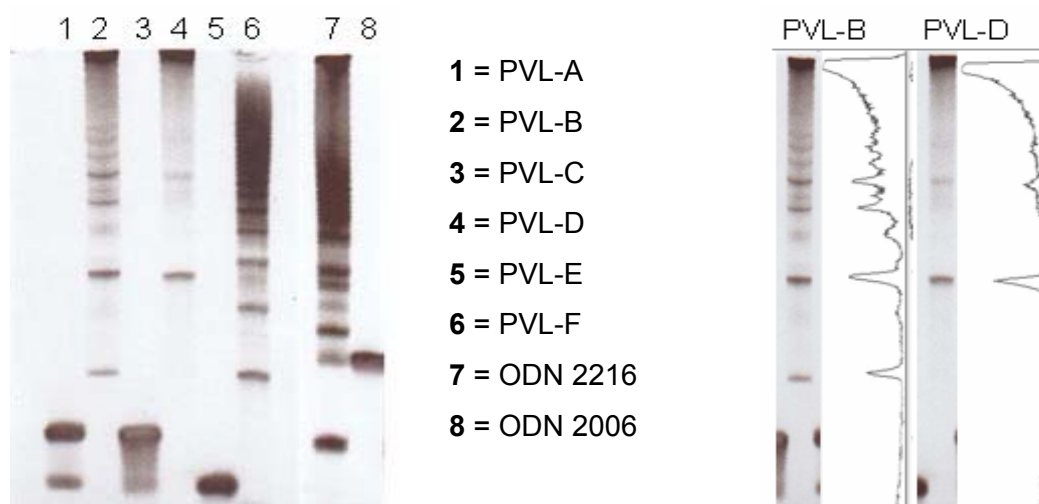


Abbildung 15: Gelelektrophorese der PVL-DNA

Es wurden jeweils 3,2 µg/ml PVL oder Kontroll-ODN in ein 10%iges Polyacrylamidgel pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei RT und 150 V für ca. 3 Stunden. Die Detektion erfolgte durch Ethidiumbromidfärbung. Die Abbildung zeigt das Gebild und die daraus erstellten Plots der Banden von PVL-B (Reihe 2) und PVL-D (Reihe 4).

3.2.1.2 Starke Induktion von Interferon-alpha in PBMCs nach Transfektion mit Poly-L-Arginin

In einem Vorversuch zeigte sich überraschenderweise keine Induktion von IFN- α bei PBMCs, wenn man die PVL auf die Zellen gab. Daher wurde Poly-L-Arginin als Transfektionsreagenz verwendet. Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden in Abbildung 16 dargestellt. Die PVL-B, -D und -F zeigen einen minimalen Eigeneffekt. Dagegen bewegt sich dieser Eigeneffekt bei PVL-A, -C und -E im Bereich der Mediumkontrolle. Vergleicht man diesen Befund mit den Ergebnissen aus Abbildung 15, so kann der sehr schwache Eigeneffekt von PVL-B, -D und -E durch das Vorhandensein der größeren Strukturen erklärt werden, jedoch wäre eine weitaus höhere Induktion von IFN- α zu erwarten gewesen. Diese kann nur durch Transfektion der PVL mit Poly-L-Arginin erreicht werden, wodurch die Wirkung der PVL-A, -C und -F gegenüber dem bisher bekannten Maximalstimulus ODN 2216 um 40 % gesteigert wird. Einen geringeren Effekt hat die Transfektion auf die Wirkung von PVL-B, -D und -E. Betrachtet man die ODN M362 und 2216, so fällt auf, dass hier durch die Transfektion mit Poly-L-Arginin die Menge an induziertem IFN- α kaum steigerbar ist. Auch zeigen diese Kontrollen, dass die ODN durch die Transfektion nicht in andere Zellkompartimente gelangen, sonst wäre die Wirkung verschlechtert.

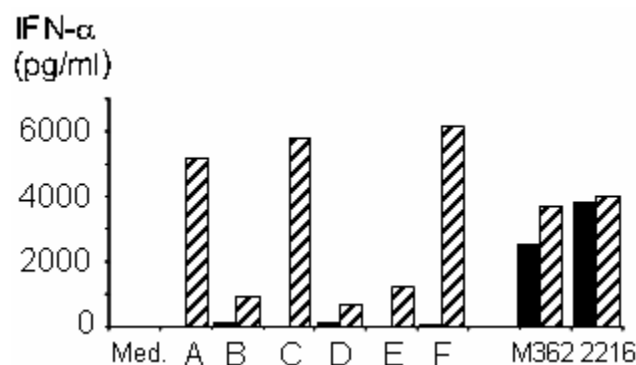


Abbildung 16: Verstärkte Induktion von IFN- α in humanen PBMCs durch die PVL-A, -C und -F, sofern diese zuvor mit Poly-L-Arginin inkubiert wurden.

PBMCs (4×10^5 /Well) wurden mit je 1,8 μ l der zuvor wie in 2.3.3.1 beschrieben erstellten ‚Master-Mixe‘ (gestreifte Balken) oder mit den PVL bzw. Kontroll-ODN allein (schwarze Balken) für 44 Stunden inkubiert, danach wurden die Überstände abgenommen und IFN- α mittels ELISA gemessen.

3.2.1.3 Screening verschieden langer Poly-L-Arginine als Transfektionsreagenzien

Nun wurden verschieden lange Poly-L-Arginine getestet, um die optimale Länge für die Transfektion der PVL zu ermitteln (Abbildung 17). Das *Screening* ergab bei den Mediumkontrollen keine eigene immunstimulatorische Aktivität der Poly-L-Arginine. Betrachtet man die Kontroll-ODN M362 und 2216, so kann die Menge an induziertem IFN- α durch die verschieden langen Poly-L-Arginine nicht gesteigert werden. Anders verhält sich jedoch das hinsichtlich der IFN- α Induktion ansonsten sehr schwache Klasse B ODN 2006. Erstaunlicherweise kann der Eigeneffekt dieses ODN durch Transfektion mit den längeren Poly-L-Argininen um bis zu 600% gesteigert werden. Bei den PVL-A, -C und -F zeigt sich eine Wirksamkeitszunahme, je länger die eingesetzten Poly-L-Arginine sind. Dieser Effekt ist bei den PVL-B, -D und -E weniger stark. Dagegen zeigen diese PVL einen schwachen Eigeneffekt auf die Zellen.

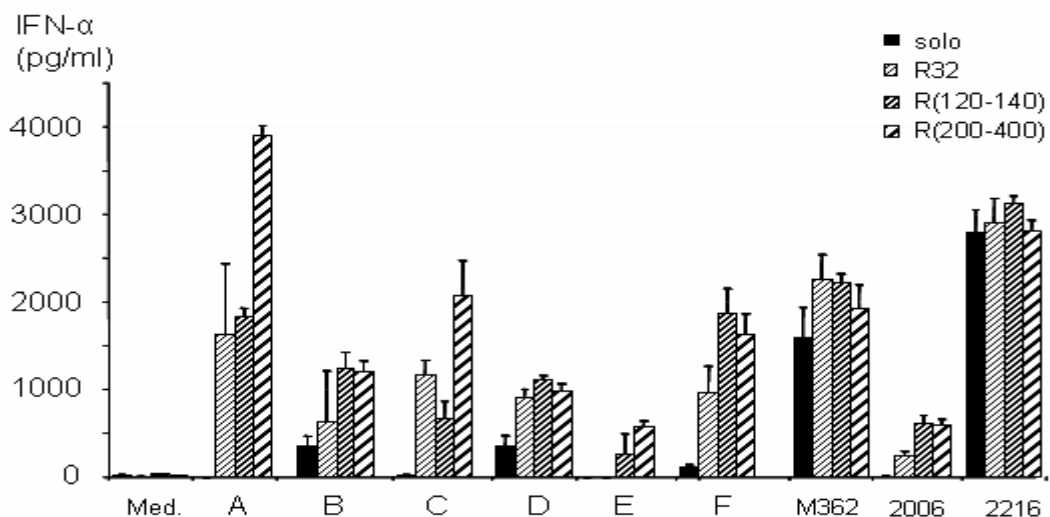


Abbildung 17: Screening verschiedener Poly-L-Arginine als Transfektionsreagenzien

PBMCs (4×10^5 /Well) wurden mit je 1,8 μ l der jeweiligen ‚Master-Mixe‘ (gemusterte Balken; in 2.3.3.1 beschrieben) transfiziert oder mit 3,2 μ g/ml der PVL-A bis -F bzw. der Kontroll-ODN alleine (schwarze Balken, ‚solo‘) für 24 Stunden inkubiert, danach wurden die Überstände abgenommen und IFN- α mittels ELISA gemessen. Es werden die Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

In Vorversuchen wurde zusätzlich die Wirksamkeit von verschieden langen Poly-L-Lysinen und einem aus Argininen und Lysinen bestehenden 32 mer Motiv des HIV-Tat-Proteins als Transfektionsreagenzien getestet. Die Tendenzen der Ergebnisse wurden bestätigt, jedoch waren sowohl die Poly-L-Lysine als auch das Tat-Polypeptid

den Poly-L-Argininen deutlich unterlegen. Darüber hinaus wurde ausgeschlossen, dass die Überlegenheit des PVL-A aus der dreifach präsentierten Menge an CpG-Sequenzen resultierte, indem die dreifache Menge der Kontroll-ODN mit konstanter Menge Poly-L-Arginin getestet wurde (Abbildungen nicht gezeigt).

3.2.1.4 Poly-L-Arginin verbessert die endozytotische Aufnahme der Polyvalenten Linker

Um sicherzustellen, dass die durch Poly-L-Arginin so deutlich verbesserte Wirksamkeit der PVL aus einer durch die Transfektion verbesserten zellulären Aufnahme resultierte, wurde die Endozytose und Makropinozytose von PBMCs durch Zugabe von Wortmannin (Abbildung 18 A) oder Cytochalasin D (Abbildung 18 B) gehemmt.

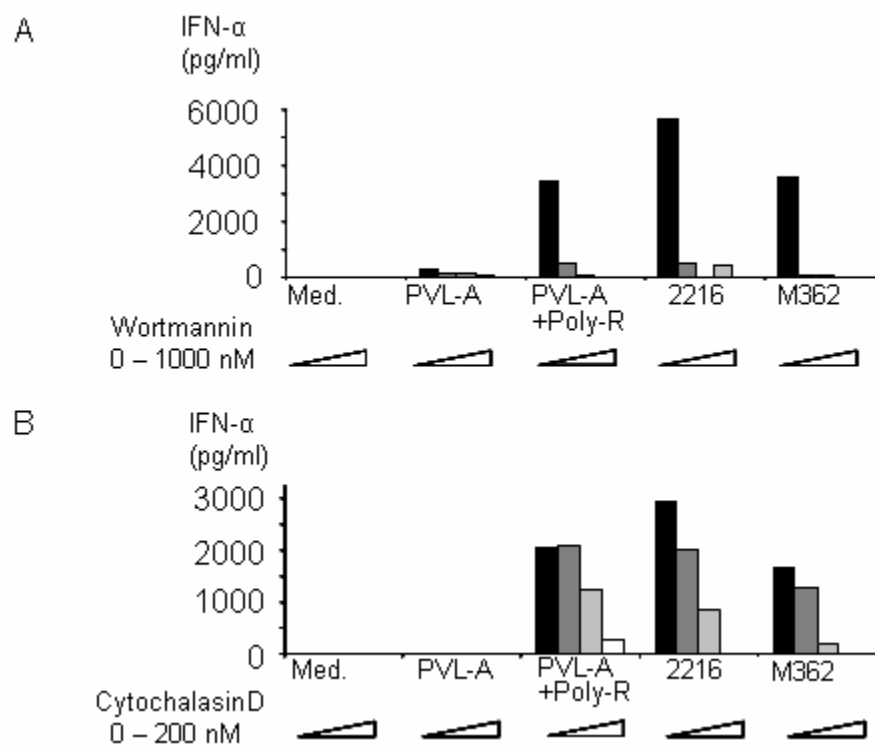


Abbildung 18: Hemmung der Makropinozytose von PBMCs durch Wortmannin (A) und Cytochalasin D (B).

PBMCs (4×10^5 /Well) wurden 30 Minuten lang mit steigenden Mengen Wortmannin (0, 100, 200, 500, 1000 nM; graue Balken; Abbildung 18 A) oder Cytochalasin D (0, 50, 100, 200 nM; graue Balken; Abbildung 18 B) vorbehandelt und dann wie in 2.3.3.1 beschrieben mit PVL-A transfiziert oder mit dem PVL alleine inkubiert. Zum Vergleich wurden 3,2 µg/ml der ODN 2216 und M362 hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und IFN-α mittels ELISA gemessen. (Schwarze Balken = Bedingungen ohne Zugabe der Hemmstoffe)

Verglichen wurden untransfizierte und transfizierte PVL-A mit den Kontroll-ODN 2216 und M362. Durch Zugabe steigender Konzentrationen Wortmannin wie auch steigender Konzentrationen Cytochalasin D lässt sich die Menge an in PBMCs induziertem IFN- α konzentrationsabhängig senken und schließlich ganz hemmen. Dieser Effekt gilt gleichermaßen sowohl für die transfizierten PVL-A als auch für die ODN-Kontrollen.

3.2.1.5 Untersuchung der CpG-Abhängigkeit des immunstimulatorischen Effektes

Es galt zu klären, ob weiterhin ein CpG-Effekt auf TLR 9 für die gute Wirksamkeit der PVL verantwortlich war, oder ob durch die Transfektion ein neuer bisher unbekannter Mechanismus genutzt wurde. Da die Synthese von PVL mit den entsprechenden Kontroll-Sequenzen zu aufwändig gewesen wäre, wurden nur die Sequenzen mit Poly-R(120-140) transfiziert. Neben den entsprechenden GpC-Kontrollen wurden DNA und PTO-Modifikationen von Sequenz 1 (,8mer') und Sequenz 2 (ODN M362) verglichen. Abbildung 19 zeigt, dass bei allen GpC-Sequenzen auch durch Transfektion mit Poly-L-Arginin keine immunstimulatorische Wirkung erzielt werden kann. Für Sequenz 1 (,8mer') wird durch die PTO-Modifizierung im Vergleich zu dem DNA-ODN eine leichte Verbesserung erreicht.

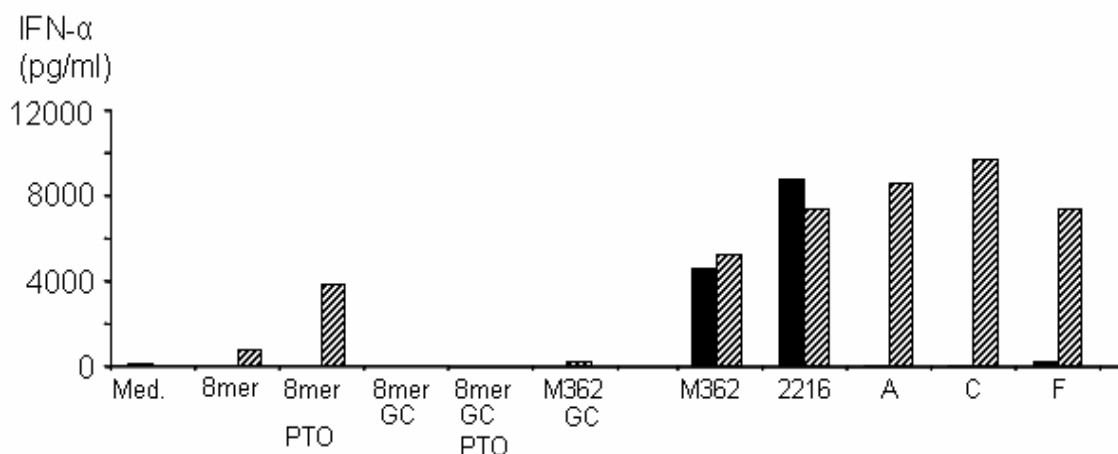


Abbildung 19: Transfektion verschiedener GpC- und PTO-Kontrollen in PBMCs

PBMCs (4×10^5 /Well) wurden mit je 1,8 μ l der jeweiligen ‚Master-Mixe‘ (gestreifte Balken; in 2.3.3.1 beschrieben) transfiziert oder mit 3,2 μ g/ml der PVL bzw. der Kontroll-ODN alleine (schwarze Balken) für 24 Stunden inkubiert, danach wurden die Überstände abgenommen und IFN- α mittels ELISA gemessen. Neben den entsprechenden GpC-Kontrollen wurden DNA und PTO-Modifikationen von Sequenz 1 (,8mer') und Sequenz 2 (ODN M362) verglichen. Die Kontrollsequenzen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

3.2.1.6 Wirkung der transfizierten Polyvalenten Linker auf plasmazytoide dendritische Zellen und B-Zellen

Da durch das Screening die längeren Poly-L-Arginine als wirkungsvoller ermittelt worden waren, wurden die PVL nun mit Poly-R(200-400) präinkubiert und isolierte PDCs (Abbildung 20) und Gesamt-B-Zellen (Abbildung 21) stimuliert. Aufgrund der durch die niedrige Zellzahl begrenzten Menge an Versuchsbedingungen wurden bei den PDCs nur die PVL-A und PVL-C getestet, welche sich in den Vorversuchen auf PBMCs als besonders wirksam erwiesen hatten. Zur Kontrolle wurde PVL-E verwendet.

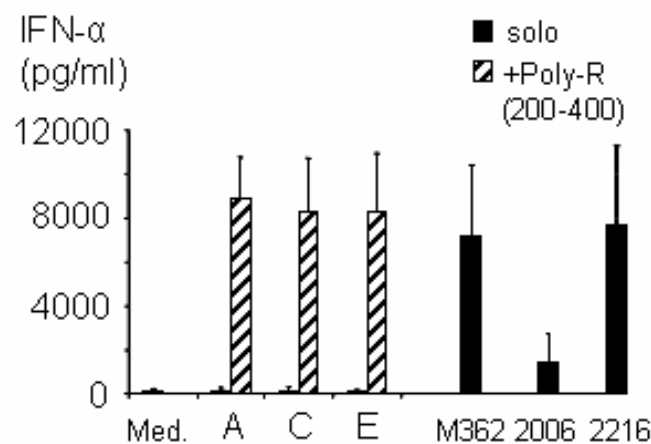


Abbildung 20: Polyvalente Linker und PDCs

Isolierte PDCs ($2,5 \times 10^4$ /Well) wurden mit je $1,8 \mu\text{l}$ der jeweiligen ‚Master-Mixe‘ (gestreifte Balken; in 2.3.3.1 beschrieben) oder mit $3,2 \mu\text{g/ml}$ der PVL bzw. der Kontroll-ODN alleine (schwarze Balken, ‚solo‘) für 24 Stunden inkubiert, danach wurden die Überstände abgenommen und IFN- α mittels ELISA gemessen. Es werden die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Abbildung 20 belegt, dass alle getesteten PVL nach Transfektion vergleichbar große Mengen IFN- α in den PDCs wie der Maximalstimulus ODN 2216 induzieren. Die Unterschiede in der Wirkung der PVL, die sich noch auf den PBMCs zeigten, sind nun nicht mehr festzustellen. Die verwendeten PVL induzieren ebenfalls hohe Mengen IL-6 und TNF- α in PDCs (Abbildung nicht gezeigt).

Bei B-Zellen zeigen die PVL-B und -D einen über die Mediumkontrolle hinausgehenden Eigeneffekt, welcher bei PVL-D sogar vergleichbar viel Proliferation in den B-Zellen auslöst wie die hier verwendeten Maximalstimuli ODN 2006 und M362 (Abbildung 21). Zusätzlich wird die Wirkung der PVL-B und -D durch Transfektion mit Poly-R(200-400) um bis zu 40 % gesteigert und ist damit den Klassen B und C deutlich überlegen. Auch hier kann die Aktivität der Kontroll-ODN durch Transfektion nicht gesteigert werden, sie ist sogar leicht vermindert.

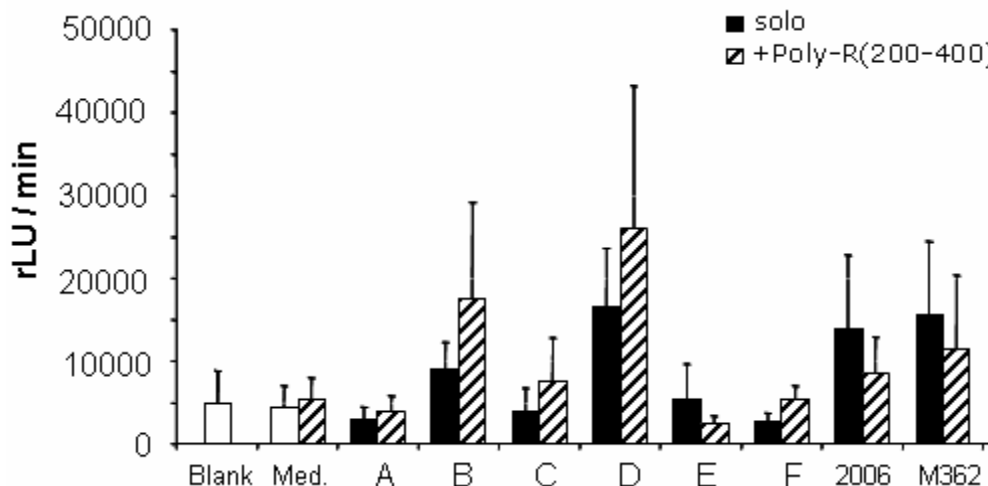


Abbildung 21: Polyvalente Linker und B-Zellen (CD19+)

Isolierte CD19⁺-Zellen (5×10^4 /Well) wurden mit je 1,8 μ l der jeweiligen ‚Master-Mixe‘ (gestreifte Balken; in 2.3.3.1 beschrieben) transfiziert oder mit 3,2 μ g/ml der PVL bzw. der Kontroll-ODN 2006 und M362 alleine (schwarze Balken) stimuliert. Die Inkubation und Detektion erfolgte nach dem Protokoll für BrdU-ELISA (2.2.4.2). Es werden die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Wichtiges und unerwartetes Ergebnis dieser ersten funktionellen Untersuchungen ist, dass die keine palindromischen Sequenzen tragenden und kaum Multimere bildenden PVL-A, -C und -E nach Transfektion besonders wirkungsvoll auf PDCs sind. Darüber hinaus erweisen sich die durch ihre palindromischen Sequenzen große Multimere bildenden PVL-B und -D sogar ohne Transfektion als sehr wirkungsvoll auf B-Zellen und vergleichbar potent wie ODN M362 und ODN 2006.

3.2.2 Trivalente Linker - palindromische RNA

In 3.2.1 wurden durch die Kombination eines trivalenten Akyllaminingrundgerüsts mit palindromischen DNA-Sequenzen höhermolekulare Strukturen generiert, die immunstimulatorisch aktiv sind. Einzelsträngige RNA kann ebenfalls sequenzabhängig Sekundär- und Tertiärstrukturen aufbauen. Ziel der folgenden Experimente war der grundsätzliche Nachweis, dass die Methode zur Generierung immunstimulatorischer Partikel auch mit palindromischen RNA-Sequenzen funktionieren würde. Zu diesem Zweck wurde das einzelsträngige RNA-Analogon von ODN M362 an trivalente Grundgerüste synthetisiert (PVL-RNA). Da DNA und RNA ein unterschiedliches Bindungsverhalten besitzen, sollte die Vergleichbarkeit der gebildeten Partikel mit den entsprechenden, die DNA-Sequenz enthaltenden Strukturen ermöglicht werden.

3.2.2.1 Strukturelle Analyse: PVL-RNA multimerisieren zu definiert aufgebauten, großen Strukturen

Zunächst wurde das PVL-RNA-Konstrukt strukturell analysiert. Um einen Eindruck von den Größenordnungen der gebildeten Partikel zu bekommen wurde das ODN 2216 als Kontrolle aufgetragen. Abbildung 22 verdeutlicht, dass bei PVL, die palindromische RNA-Sequenzen enthalten, ein definierter Partikel Aufbau erfolgt, da sich kein ‚Schmier‘ sondern klar voneinander abgegrenzte, leiterartige Banden bis hinauf zu der Geltasche zeigen. Außerdem scheinen diese Strukturen deutlich größer als die Partikel des ODN 2216 zu sein, da sie langsamer im Gel laufen und teilweise in der Geltasche retardiert werden.

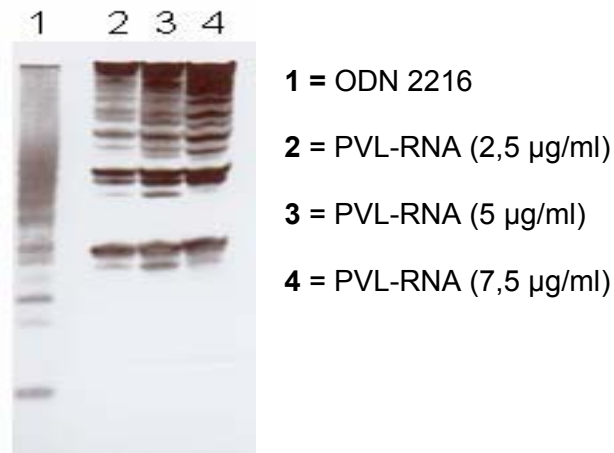


Abbildung 22: Gelelektrophorese der Polyvalenten Linker-RNA

Es wurden jeweils 2,5; 5; 7,5 µg/ml PVL oder 3,2 µg/ml Kontroll-ODN in ein 10%iges Gel pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei 150 V für ca. 3 Stunden bei RT. Zur Detektion wurde die Ethidiumbromidfärbung verwendet.

Abbildung 23 ermöglicht den Vergleich der Gelläufe von PVL-RNA und PVL-D mittels ihrer Plotting-Auswertungen.

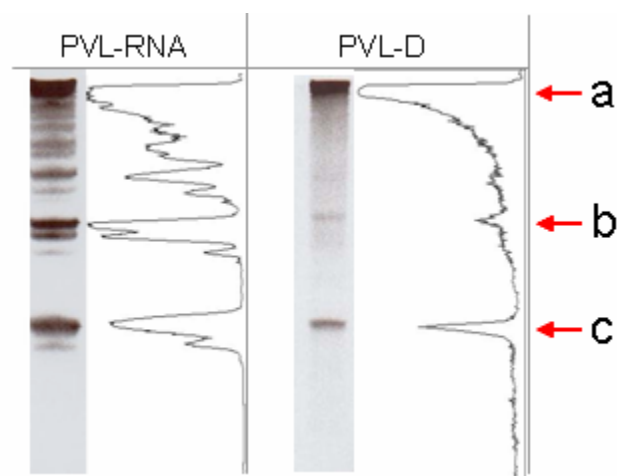


Abbildung 23: Plotting-Auswertungen von PVL-RNA und PVL-D

Die Auswertungen wurden aus Abbildung 15 und Abbildung 22 unter Bezugnahme auf die Laufhöhen von ODN 2216 durchgeführt.

Beide trivalenten Linker enthalten die palindromische Basenfolge von ODN M362, wobei diese bei PVL-D als DNA- und bei PVL-RNA als RNA-Sequenz vorliegt. In beiden Fällen verbleibt ein Großteil der gebildeten Partikel in der Geltasche (Laufhöhe ,a'). Die gemeinsamen Banden bei den Laufhöhen ,b' und ,c' weisen auf

ähnliche Grundsatzmechanismen zum Partikel Aufbau basierend auf der gemeinsamen palindromische Sequenz hin. Dennoch sind bei PVL-RNA deutlich mehr Partikel in den kleineren und mittleren Größenordnungen vorhanden (Laufhöhen ,a' bis ,b'). Dies spricht für einen weniger stark ausgeprägten Aufbau sehr großer Partikel und die darauf basierende Existenz kleinerer und mittlerer Grundstrukturen. Diese Unterschiede in der Strukturbildung belegen, dass einzelsträngige palindromische DNA- und RNA-Sequenzen nicht dasselbe Bindungsverhalten bei der Duplexbildung besitzen.

3.2.2.2 Induktion von Interferon-alpha in PBMCs nach Transfektion mit Poly-L-Arginin

In einem Vorversuch wurde nach Stimulation von Monozyten mit PVL-RNA kein TNF- α produziert. Ebenfalls zeigte sich keine Induktion von IFN- α bei PBMCs. Daher wurde Poly-L-Arginin als Transfektionsreagenz verwendet.

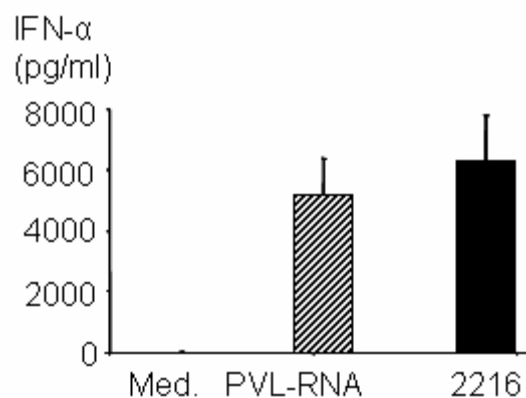


Abbildung 24: PVL-RNA induzieren nach Transfektion hohe Mengen IFN- α in PBMCs

PBMCs (4×10^5 /Well) wurden mit 1,8 μ l des zuvor wie in 2.3.3.1 beschrieben erstellten ‚Master-Mixes‘ (gestreifter Balken) oder mit 3,2 μ g/ml des PVL-RNA bzw. der Kontroll-ODN (schwarze Balken) für 24 Stunden inkubiert, danach wurde IFN- α mittels ELISA der Überstände gemessen. Es werden die Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Abbildung 24 zeigt, dass das PVL-RNA-Konstrukt untransfiziert kein IFN- α in PBMCs induziert. Nach Transfektion wird jedoch eine vergleichbar hohe Menge IFN- α produziert wie durch ODN 2216 als Maximalstimulus.

4 DISKUSSION

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Möglichkeiten und Grenzen der Gelelektrophorese zur Simulation physiologischen Milieus

Um Unterschiede in der Multimerisierung der verschiedenen CpG-Klassen zu untersuchen, bieten sich verschiedene Methoden an. Da zugleich aber Ziel dieser Arbeit war, Rückschlüsse auf das Verhalten *in vivo* ziehen zu können, war die Vorgabe, die Untersuchungen unter dem physiologischen Milieu weitestgehend angenäherten Bedingungen durchzuführen. Die native Gelelektrophorese stellt eine geeignete Methode dar, ein Gemisch aus vielen verschiedenen großen Komplexen aufzutrennen und deren Größenordnungen zu visualisieren. Polyacrylamidgele sind dabei Agarosegelen bezüglich der Auflösung und Trennschärfe überlegen. Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, wurde das Standardprotokoll für die jeweiligen Untersuchungen zur Simulation physiologischer Bedingungen modifiziert.

Die Strukturbildungen wurden bei verschiedenen Pufferkonzentrationen untersucht. Idealerweise sollen hier die annähernd gleichen Ionen-Konzentrationen in Probe und Laufpuffer herrschen, sonst wird der Gellauf verzerrt. In manchen Experimenten war die Einhaltung dieser Regel nicht möglich und die Gelelektrophorese dadurch an ihre Grenzen gebracht. Wurden die Proben in Aqua ad inj. gelöst, konnte nicht auf den Laufpuffer (TBE) verzichtet werden, da ohne Ionen kein Strom fließt. Andererseits führte eine zu hohe Konzentration an Kaliumionen in Vorversuchen aufgrund der hohen Stromstärke zu einer übermäßigen Erwärmung des Gels (z. B. 2 molar K^+ , Abbildung nicht gezeigt). Eine mögliche Beeinflussung der Strukturen durch Kontakt mit dem Laufpuffer erscheint unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.1.2 Wahrscheinlichkeit von strukturellen Veränderungen der PVL-Partikel durch die Inkubation mit Poly-L-Arginin

Kationische Peptide, sog. *Protein Transduction Domains* (PTDs), sind häufig genutzte *Carrier* für Makromoleküle. Die positive Ladung ist essentiell für eine gute Transporterwirkung und Arginin hat hier einen stärkeren Effekt als Lysin oder Histidin. Die genauen Aufnahmemechanismen werden kontrovers diskutiert. Für ein Nonaarginin wurde gezeigt, dass es an Zelloberflächenheparin bindet, dann endozytotisch aufgenommen und in endozytotischen Vesikeln durch Degradation des Heparins freigegeben wird [Fuchs und Raines 2004]. Für große und mittelgroße argininreiche Fusionsproteine des HIV-1 TAT-Proteins (> 30 kDa und 1000-5000 Da) wurde eine Flüssig-Phasen-Makropinozytose diskutiert, welche unabhängig von Caveolae-, Clathrin- oder Dynamin-Wegen sein soll. Nach ionischer Interaktion an der Zelloberfläche werden die PTD durch rezeptorunabhängige Makropinozytose aufgenommen und aus den Makropinosomen wieder freigegeben [Kaplan et al. 2005].

Ein Ergebnis dieser Dissertation ist, dass die Aufnahme der PVL/Poly-R-Partikel ebenfalls durch Makropinozytose erfolgt. Mittels Zugabe der Makropinozytosehemmer Cytochalasin D oder Wortmannin war diese konzentrationsabhängig hemmbar. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Transport der Partikel trotz Transfektion zum TLR 9 erfolgt, weil die Wirkung der PVL immer noch auf einem CpG-Effekt beruhte.

Zu bedenken sind die strukturellen Veränderungen, die die Inkubation mit Polykationen nach sich zieht und die eine Vergleichbarkeit der durch Transfektion gewonnenen funktionellen Daten mit denen der strukturellen Untersuchung behindert. Für DNA-Polykationkomplexe wurde eine hexagonale Struktur bzw. Zusammenlagerung berichtet. Allerdings wurde hier hochpolymerisierte DNA aus dem Kalbsthymus mit genau der Menge Polykationen versetzt, dass die gebildeten Komplexe nach aussen hin neutral geladen waren [DeRouchey et al. 2005]. In der vorliegenden Arbeit waren die eingesetzten Poly-R um vieles länger als die PVL-DNA, allerdings in geringerem Anteil eingesetzt. Statistisch gesehen liegen die gebildeten Partikel dann als Knäuel mit einem Überschuss an negativer Ladung vor (durch die in höherem Anteil vorhandenen Nukleinbasen). Eine strukturelle Veränderung erscheint sehr wahrscheinlich, konnte aber nicht gelelektrophoretisch untersucht werden, da die

großen PVL/Poly-R-Partikel im Gel nicht mehr wandern. Außerdem wurde auf ein bereits aus Vorversuchen zur RNA-Transfektion bestehendes Mischungsverhältnis der ODN zu Poly-R zurückgegriffen. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden synthetisierten Menge an PVL-DNA bzw. PVL-RNA wurde auf eine Austitration der optimalen die Ladungen betreffenden Mischungsverhältnisse zugunsten erster funktioneller Untersuchungen verzichtet. Die daraus resultierenden möglichen Einflüsse auf die gebildeten Strukturen werden im Folgenden exemplarisch für PVL-A und PVL-B diskutiert. Wenn im Protokoll jeweils 0,3 µg/ml Poly-R auf 4 µg/ml PVL eingesetzt wurden, muss man die sehr unterschiedlichen Molekulargewichte und die dadurch bedingten molaren Verhältnisse (und damit die Ladungsverhältnisse) bedenken. Bei den Berechnungen wird das Molekulargewicht (MW) von Arginin (MW = 174,2) verwendet und dessen Polymerisationsgrad zunächst vernachlässigt.

- PVL-A (MW = 7452,78) trägt dreifach die kurze Sequenz 1 (MW = 2392). Die molaren Verhältnisse bei der Transfektion waren 1,72 nMol (R) zu 0,171 nMol (PVL-A), also ungefähr 10 : 1 (R : PVL-A). Bei Verwendung eines 120mer Arginins beträgt das Verhältnis 120 : 12, das bedeutet pro Argininkette (mit einer Länge von 120 Aminosäuren) werden 12 PVL-A Moleküle gebunden, die jedoch jeweils dreifach Sequenz 1 (8 Basen) enthalten. Das Verhältnis der Ladungen beträgt somit 120 : 288 (entspricht $12 \times 3 \times 8$; 12 Moleküle mit je 3×8 Nukleinbasen) oder vereinfacht 1 : 2,4 (positive Ladungen aus dem Poly-L-Arginin zu negativen Ladungen aus den Nukleinbasen).
- PVL-B (MW = 23270,07) trägt dreifach die längere palindromische Sequenz 2 (MW = 7664). Die molaren Verhältnisse waren hier 1,72 nMol (R) zu 0,538 nMol (PVL-B), also ca. 3 : 1 (R : PVL-B). Bei Verwendung eines 120mer Arginins beträgt das Verhältnis in diesem Fall 120 : 40, es werden also pro Argininkette (mit einer Länge von 120 Aminosäuren) 40 Moleküle PVL-B gebunden, die allerdings jeweils dreifach Sequenz 2 (25 Basen) enthalten. Das Verhältnis der Ladungen beträgt hier 120 : 3000 ($40 \times 3 \times 25$; 40 Moleküle mit 3×25 Nukleinbasen) oder vereinfacht 1 : 25 (positive Ladungen aus dem Poly-L-Arginin zu negativen Ladungen aus den Nukleinbasen). Dieser Überschuss an Ladungen bedeutet, dass nur ein Teil PVL-B an Poly-L-Arginin binden kann. Die ‚freien‘ palindromischen Sequenzen des Protein-Nukleinsäure-Partikels könnten weitere PVL binden. Dadurch würde eine Art Nukleinsäureschicht um diesen Partikel gebildet (dargestellt in Abbildung 25).

Durch die differenziellen Ladungsverhältnisse dürften sich die Strukturen unterschiedlich ausrichten, ein hypothetisches Modell ist in Abbildung 25 dargestellt. Inwiefern diese die funktionellen Daten beeinflussen, sollte Gegenstand weiterer Untersuchung sein und in die Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen werden.

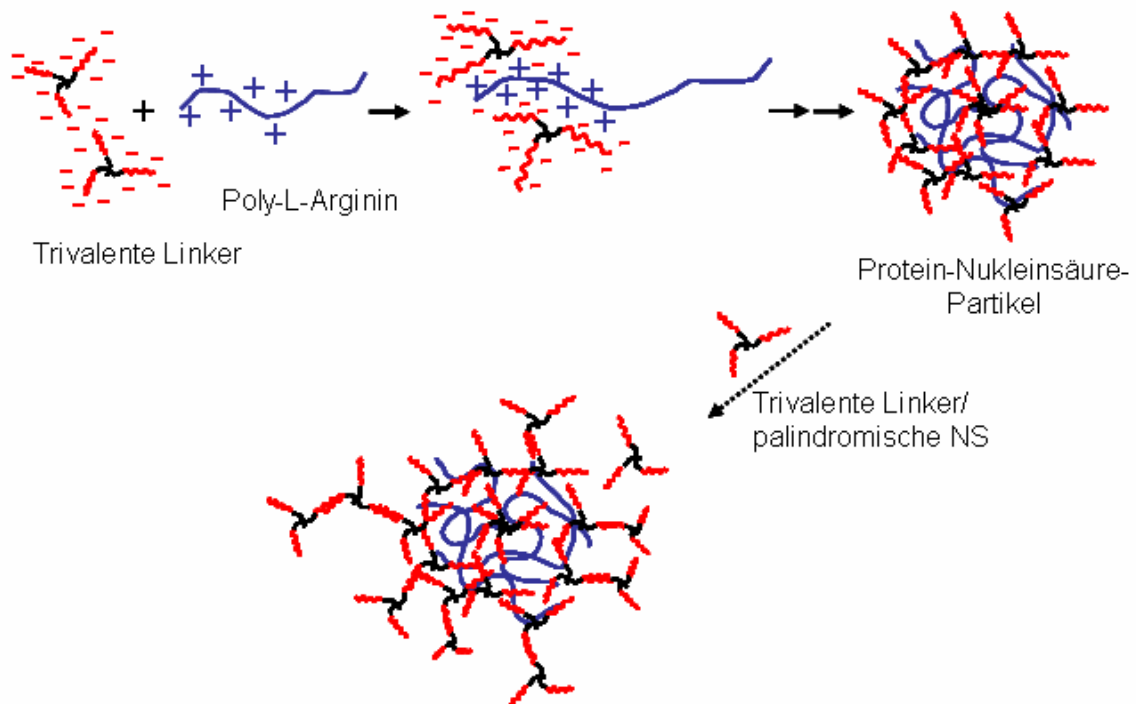


Abbildung 25: Hypothetisches Modell der Komplexbildungen zwischen Argininketten und trivalenten Linkern (schematisiert)

'Palindromische NS' bezeichnet palindromische Nukleinsäuren (wie in PVL-B, PVL-D und PVL-RNA). In diesem Falle könnten zusätzlich nicht-Arginin-gebundene PVL an freie Palindromsequenzen des Protein-NS-Partikels binden. Im Fall der nicht-palindromischen Sequenz 1 (PVL-A und PVL-C) würde nur die Zusammenlagerung bis zu dem Protein-Nukleinsäure-Partikel ablaufen können, bei dem sich die NS-Sequenzen aufgrund des Ladungsüberschusses außen befinden bzw. „igelartig“ herauszeigen würden.

4.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen von ODN 2216 (CpG-A)

4.2.1 Zusammenspiel aus Poly-Guanin-Sequenzen, Palindrom und monovalenten Kationen (Na^+/K^+) zur Strukturbildung im physiologischen Milieu

CpG-A besitzt mit dem zentralen Palindrom und seinen flankierenden Poly-G-Motiven zwei charakteristische Sequenzelemente, die gleichermaßen entscheidend zum Aufbau höherer Strukturen beitragen.

5'-GGGGGACGATCGTCGGGGG-3'

Abbildung 26: Sequenz von ODN 2216

Das Palindrom ist unterstrichen.

4.2.1.1 Bildung von G-Tetraden aus Poly-Guanin-Motiven

Als Poly-G-Motive bezeichnet man eine Sequenz mit mehr als 3 aufeinanderfolgenden Guanin-Molekülen. Jedes Guanin verfügt über vier reaktive Zentren, an denen Wasserstoffbrücken gebildet werden können. Indem sich jeweils vier Guanin-Moleküle einzelner DNA-Stränge zu zyklischen Basenquartetten formieren, werden sog. G-Tetraden gebildet. Diese werden über jeweils acht Wasserstoffbrücken, sog. Hoogsteen-Bindungen, stabilisiert (Abbildung 27). Durch Verknüpfung von vier Einzelsträngen mittels G-Tetraden an dem einen Ende und Bindung weiterer Einzelstränge an den anderen Nukleinsäure-Enden können sich Strukturen höherer Ordnung aufbauen [Kerkmann et al. 2005].

4.2.1.2 Multimerisierungen von G-Tetraden-Grundstrukturen zu größeren Partikeln mit Hilfe des zentralen Palindroms

Es stellte sich die Frage, auf welche Weise das Palindrom am Strukturaufbau beteiligt sein könnte. Ein zentrales Palindrom schafft theoretisch die Möglichkeit, Duplices über Watson-Crick-Bindungen zu bilden. Diese Basenpaarungen werden in der Natur als die stabilere und dominierende Bindungsform von DNA unter physiologischen Bedingungen angesehen [Phan und Mergny 2002], daher ist es nahe liegend, dass die Duplexbildung der initiale Schritt der Multimerisierungen sein könnte.

Werden die ODN durch die Temperatur-Präinkubation erhitzt, so bilden sich größere Strukturen weder bei ODN 2216 und noch bei einem Kontroll-ODN, in dessen Palindromsequenz *mismatches* eingebaut sind (2216zP; Abbildung 4, S. 54). Nur die ‚Grundstrukturen‘ (Laufhöhe ‚b‘) sind vorhanden. Bei 37°C können sich ohne Palindrom nur Strukturen bis zu einer mittleren Größenordnung G-Tetraden-basiert zusammenlagern, wobei auch in diesem Fall die ‚Grundstrukturen‘ noch vorhanden sind. Im Gegensatz dazu sind sie bei ODN 2216, welches bei 37°C auch große Partikel bildet, verschwunden. Mit der Entfernung des Palindroms werden offensichtlich weitere Multimerisierungen von ODN 2216zP zu verzweigten und großen Partikeln verhindert. Es ist denkbar, dass die Duplices als Ausgangsstrukturen die Orientierung und Ausrichtung der vier Sequenzen zu G-Tetraden deutlich erleichtern und weitere Anlagerungen bei den Multimerisierungen zu großen Partikeln erst ermöglichen.

Die experimentellen Befunde bei der Partikelgrößenmessung unterstützen diese Hypothese (Abbildung 2, S. 50). Bei DNA ist nach 10 Basen und 3,4 nm Länge eine 360°-Drehung der Helix vollzogen. Für ein helicales 20mer dsODN würde sich eine Länge von 6,8 nm ergeben. Es ist jedoch anzunehmen, dass ein Doppelstrang des ODN 2216 (insgesamt 24 Basen Länge durch leichte Verschiebung) wegen der vielen Guanine nur annähernd helical vorliegen würde und daher eher noch länger wäre (ca. 8,2 nm). Die kleinsten in dieser Arbeit gemessenen Partikel haben zwar eine Größe von 15,8 nm, die Durchmesser wurden jedoch bei angenommener globulärer Form berechnet, die im Fall von Duplices nicht vorliegt. Außerdem befanden sich die ODN in wässriger Lösung, es wurde daher die Hydrathülle mitgemessen. Im Rahmen der auf diesen Einschränkungen beruhenden Messungenauigkeit könnten Duplices die Ausgangsstrukturen der Multimerisierungen sein.

4.2.1.3 Stabilisierung der G-Tetraden durch zentral eingelagerte monovalente Kationen (Na^+/K^+)

Werden die ODN in reinem Wasser gelöst, so können sie nach einem Erhitzungsschritt trotz des Palindroms und der Poly-G-Motive keine Strukturen aufbauen (Abbildung 5, S. 55). Dies ist nur in Anwesenheit von Na^+ oder K^+ möglich. Das für die optimale Strukturbildung wesentliche Zusammenspiel aus Poly-G-Motiven, Palindrom und den umgebenden monovalenten Kationen wird damit erstmalig demonstriert. Sen und Gilbert wiesen im Zusammenhang mit humanen Telomeren-Sequenzen nach, dass das Verhältnis zwischen Na^+/K^+ -Konzentration entscheidend für die Art der gebildeten G-Tetradenformationen war. Komplexe Strukturen wurden nur bei hohen Na^+ -Konzentrationen gebildet, weil K^+ kleinere Strukturen in so hohem Maße stabilisierten, dass größere Formationen nicht mehr gebildet werden konnten [Sen und Gilbert 1990; Sen und Gilbert 1992]. Basu et al. konnten bei 37 °C keine G-Quadruplex-Bildung eines Poly-G tragenden ODN sowohl bei interstitiellem und intrazellulärem Na^+/K^+ -Verhältnis als auch bei physiologischen Na^+ -Konzentrationen (ohne K^+) beobachten [Basu und Wickstrom 1997].

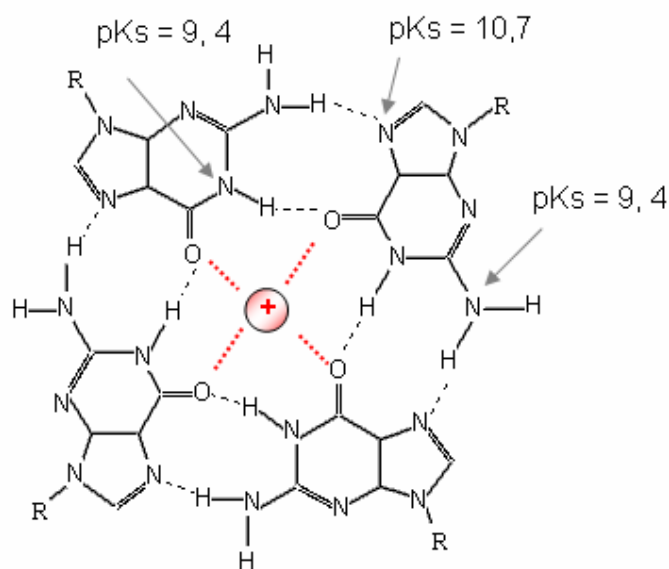


Abbildung 27: Modell einer G-Tetrade, gebildet aus vier Guanin-Molekülen mit zentralem monovalentem Kation

Durch das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll der Temperatur-Präinkubationen existiert eine wirksame Möglichkeit, die Multimerisierungen von ODN 2216 experimentell zu kontrollieren und sowohl durch die Gelelektrophorese optisch nachzuvollziehen als auch im Zellversuch funktionell zu untersuchen. In diesem Zusammenhang ist es nicht nur ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit, dass sich die Strukturen bei ODN 2216 unbeeinflusst von den jeweils hohen Natrium- oder Kaliumionenkonzentrationen im interstitiellen oder intrazellulären Milieu gleichermaßen bilden. Darüber hinaus ist die physiologische Präinkubations-Temperatur (37 °C) im Gegensatz zu niedrigeren (15 °C) oder höheren (60 °C) Temperaturen sogar förderlich für diese Vorgänge. Die monovalenten Kationen Na^+ und K^+ können sich vermutlich trotz ihrer leicht unterschiedlichen Atomgrößen gleichermaßen in die von ODN 2216 gebildeten G-Tetraden zentral einlagern und sie dadurch stabilisieren (Abbildung 27). Zusätzlich werden durch die stabilisierende Wirkung des Palindroms mögliche destabilisierende Ioneneinflüsse ausgeglichen.

4.2.2 Definierter Partikel Aufbau trotz konzentrationsabhängiger Umlagerungen

Auch wenn ODN 2216 in PBS vermutlich ein äusserst heterogenes System großer und kleiner Partikel von globulären oder auch linearen Formen darstellt, so scheint der Partikel Aufbau präzisen Mechanismen zu unterliegen. Die Partikelgrößenmessung ergab mittlere Partikeldurchmesser von 24 nm bis 40 nm bei Polydispersitäten zwischen 3,87 und 4,09 (Abbildung 2, S. 50). Die Polydispersität (D) bezeichnet das Verhältnis der Partikelgrößen zur durchschnittlichen Partikelgröße. $D = 1$ würde ein ideales homogenes System beschreiben, bei $D = 200$ wäre eine Mischung sehr heterogen. Mittlere Polydispersitäten von ca. 4 bedeuten also nicht unbedingt eine so große Heterogenität, wie immer für ODN 2216 vermutet worden war. Die Tatsache, dass nicht bei der größten Konzentration (1000 µg/ml; 150 µmol) auch die größten Partikel gemessen worden sind, sondern bei einer Konzentration von 500 µg/ml (75 µmol), ist überraschend. Eine Partikelformation aus kleinen zu verzweigten Tetradenstrukturen wird zwar als Gleichgewichtsreaktion beschrieben [Sen und Gilbert 1990], jedoch wäre zu erwarten gewesen, dass eine höhere Konzentration zur Verfügung stehender ODN auch größere Partikel bilden würde.

Die Bestimmung der Partikelgrößen war aus einem Ansatz durch 1:2 Verdünnung und sofortiger weiterer Messung erfolgt. Es müssen demnach konzentrationsabhängige, relativ schnelle Umlagerungsprozesse stattgefunden haben. Diese Überlegungen müssen in die Interpretationen der Struktur-Wirkungsbeziehungen einbezogen werden. Außerdem wäre die Kenntnis dieser Prozesse in Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz wichtig, wo das ODN durch die Injektion ebenfalls einem Konzentrationsgradienten unterworfen würde. Andererseits scheinen auch für den Fall einer raschen und hohen Verdünnung ähnliche Gesetze zum Partikel Aufbau zu gelten, sonst wären die Gelbilder des im femtomolaren Konzentrationsbereich aufgetragenen DIG-markierten ODN 2216 nicht mit denen des im μ molaren Bereich aufgetragenen, unmarkierten ODN 2216 identisch gewesen. Die kaum variierenden Polydispersitäten unterstützen diese Vermutung. Es ist möglich, dass sich trotz der Umlagerungsprozesse wieder schnell eine bestimmte (energetisch begünstigte) Bandbreite an Partikelgrößen einstellt, welche in ihrer Zusammensetzung bzw. in den Verhältnissen großer Partikel zu kleinen Partikeln vergleichbar ist.

4.2.3 Die Multimerisierung zu höhermolekularen Strukturen ist die Voraussetzung für die hohe Induktion von Interferon-alpha in plasmazytoiden dendritischen Zellen

Im Zellversuch zeigte der Vergleich der unbehandelten ‚Positivkontrolle‘ mit den durch Temperatur-Präinkubation generierten Partikeln, dass nur die großen, in Anwesenheit von Na^+ gebildeten Strukturen für die rasche Induktion hoher Mengen IFN- α (wie auch TNF- α und IL-6) in PDCs verantwortlich sind (Abbildung 6, S.56). Entzieht man den ODN durch vorheriges Lösen in Aqua ad inj. und einen Erhitzungsschritt die Grundlage zur Bildung höhermolekularer Strukturen, so verlieren sie ihre Wirkung auf die Zellen fast vollständig (hinsichtlich TNF- α bis auf Mediumniveau). Je größer und je verzweigter die partikulären Strukturen aufgebaut sind, umso anfälliger sind sie, bei höheren Temperaturen (wie hier 60 °C) thermisch instabil zu werden und ihre Bindungen zu öffnen. Dadurch werden kleinere, am Strukturaufbau beteiligte Formationen freigegeben und auch auf dem Gel sichtbar. Diese mittleren und kleinen Strukturen haben jedoch eine signifikant niedrigere Wirkung auf die PDCs. In Bezug auf CpG-A und die durch diese Klasse ausgelösten Signalwege gilt demnach die

Existenz großer partikulärer Strukturen als unbedingte Voraussetzung für die funktionelle Wirkung.

Dies wird zusätzlich durch die Beobachtung bestätigt, dass die durch ODN 2216 induzierte Menge IFN- α sich durch Präinkubation des ODN mit Guanosin noch einmal deutlich steigern lässt (Bekeredjian-Ding, unveröffentlichte Beobachtung). Die zusätzlichen Guanosine dürften zu einer noch größeren und verzweigteren G-Tetradenstrukturbildung beigetragen haben. Auf andere CpG-Klassen lässt sich diese Folgerung jedoch nur bedingt übertragen. Die (geringe) Induktion von IFN- α mRNA durch Einfügen von Poly-G-Motiven an das 3'-Ende von ODN 2006 ließ sich sowohl bei der PTO- als auch bei der DNA-Sequenz nicht steigern, obwohl dadurch die Bildung von G-Tetraden wie auch eine verbesserte Aufnahme ermöglicht wurde [Bartz et al. 2004]. Verlieh man ODN 2006 jedoch durch Adsorption mehrerer ODN an Polystyrolnanopartikel eine partikuläre Struktur, so wurde mehr IFN- α als durch ODN 2216 induziert [Kerkmann et al. 2005].

Wu et al. vermuteten als Voraussetzung für eine TLR 9 Aktivierung die Aggregation von PTO-CpG-ODN [Wu et al. 2004]. Die Aggregation wurde vor allem durch Poly-G Motive am 3'-Ende verursacht. Die Bindungen an Plasmaproteine sollte zusätzlich eine entscheidende Rolle in dieser Aggregation spielen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde bei den verschiedenen generierten ODN 2216-Partikeln jedoch kein Effekt durch Proteinbindungen auf die immunstimulatorische Wirkung festgestellt (verglichen wurden 30minütige Präinkubationen der temperaturvorbehandelten CpG-A ODN und der ‚Positivkontrolle‘ mit BSA, FCS und autologem Serum, Abbildungen nicht gezeigt).

4.2.4 Erklärungsmodelle für die hohe Induktion von Interferon-alpha durch große 2216-Partikel

Trotz der in dieser Arbeit demonstrierten pH-Labilität der großen Strukturen, führen nur diese zu einer hohen Induktion von IFN- α , TNF- α und IL-6. Es muss also weitere für die Aggregate spezifische Mechanismen geben, die in dem Zeitraum zwischen Aufnahme und TLR-CpG-Bindung ausgelöst für diese im Vergleich zu einzelsträngigen ODN stärkere Wirkung verantwortlich sind.

4.2.4.1 Aktivierung eines autokrinen *feedback-loops* für Interferon-alpha durch CpG-A

Es konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden, dass die IFN- α Induktion in PDCs abhängig vom Stimulus über zwei regulatorische Signalwege vermittelt abläuft. Der IRF-7 wird bei der PDC im besonderen Maße konstitutiv exprimiert. Durch bereits kleine Mengen an Typ-I IFN, wie sie in der frühen Phase der Reaktion auf einen Stimulus induziert werden, wird auf autokrinen Weg der Typ-I-IFN-Rezeptor stimuliert und dadurch die Expression von IRF-7 induziert und dieser stark aufreguliert [Kerkmann et al. 2003]. Die daraus resultierende Erhöhung der zytoplasmatischen Konzentration des IRF-7 Proteins ermöglicht bei weiterer Stimulation die sofortige maximale Induktion der IFN- α Expression [Hata et al. 2001]. Dadurch verstärkt IFN seine eigene Produktion. Dieser *Priming* Effekt ist für die frühe Phase einer Virusinfektion ein wichtiger regulatorischer Mechanismus zum schnellen Aufbau wirksamer Konzentrationen an IFN- α . Da die PDCs sowohl im peripheren Blut als auch nach Rekrutierung an den Ort inflammatorischer Aktivität in vergleichsweise geringen Konzentrationen vorliegen, hat die Optimierung der IFN- α Freisetzung evolutiv eine große Bedeutung.

In dieser Arbeit konnte die Wirkung der schwächeren kleinen 2216 Partikel bzw. der Monomere durch Präinkubation der Zellen mit IFN- β um das Vierfache gesteigert werden. Eine wahrscheinliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass durch die großen 2216 Partikel über IRF-7-Aufregulation ein autokriner *Feedback*-Mechanismus aktiviert wird und das ODN somit seine eigene IFN- α Induktion steigert und andauern lässt. Die Kinetik des ODN beweist, verglichen mit den anderen Klassen, eine relativ frühe Sekretion von IFN- α , welche nach raschem Anstieg in ein Plateau mündet. Den kleineren Partikeln gelingt es möglicherweise nicht massiv genug, diese Mechanismen zu stimulieren; infolge dessen sind ihre Kinetiken langsamer ansteigend und erreichen ein niedrigeres Plateau. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass die großen 2216-Partikel ihre Bindungen bei niedrigen pH-Werten öffnen, wie sie während der endosomalen Reifung auftreten. Vorstellbar ist daher auch, dass die stetige Freigabe der in den großen Partikeln vielfach präsentierten CpG-Sequenzen auf relativ engen Raum während der endosomalen Reifung für das nötige Andauern der Signale sorgt. Pharmazeutisch betrachtet würden große Partikel quasi eine Art ‚Depotform‘ darstellen, während die kleinen Partikel für den ‚Bolus‘, die schnelle Induktion des Zytokins und Aufregulation von IRF-7, verantwortlich sein könnten. Auch aus diesem Grund war das

ursprüngliche Gemisch der ODN 2216 aus primär großen aber auch kleineren Partikeln durch experimentellen Einfluss in seiner Wirkung kaum steigerbar.

4.2.4.2 *Clustering* und *Crosslinking* von TLR 9

Es ist ebenfalls vorstellbar, dass durch die in großen 2216 Partikeln in unmittelbarer räumlicher Nähe präsentierte Menge an CpG-Motiven ein zusätzliches (frühes) Signal initiiert wird, welches zu einer Rezeptoraggregation in den entsprechenden Kompartimenten führt. Ein *Crosslinking* der akkumulierten Rezeptoren durch bei pH 5 noch vorliegende kleinere Strukturen oder durch eine hohe Menge Einzelstränge könnte die Aktivierung eines verstärkenden Signalweges erklären, welcher zur erhöhten Expression von IFN- α führt. Dieser könnte durch einzeln pro Endosomen vorliegende ODN nicht ausgelöst werden, obwohl sie die Zelle aktivieren.

TLR gehören zu der Familie der IL-1 Rezeptoren. Studien des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers haben die Fähigkeit von IL-1 nachgewiesen, eine Rezeptoraggregation (*Clustering*) und eine funktionelle Rezeptorantwort auszulösen. Für TLR 4 wurde ein entsprechender Mechanismus bereits postuliert [Visintin et al. 2003] und auch für TLR 9 konnte eine Rezeptoraggregation nachgewiesen werden. Bei Beobachtungen der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zwischen PDC und T-Zelle wurden ähnliche Abläufe festgestellt. Es kam zu einer erhöhten Dichte an Rezeptormolekülen in Mikrodomänen der Zellmembran. Bei Interaktion mit einem multimeren Stimulus initiierte dieser entweder erstmalig ein Signal oder führte zu einer Verstärkung eines bereits bestehenden Signals [Monks et al. 1998; Vereb et al. 2000]. Der synthetische IL-1 Rezeptorantagonist Anakinra®, welcher zur Therapie von rheumatoider Arthritis eingesetzt wird, interagiert mit dem IL-1 Rezeptor, ohne eine entsprechende Rezeptoraggregation auszulösen. Analog erscheint ein Modell sehr wahrscheinlich, bei dem das unterschiedliche Aktivierungsprofil der CpG-Klassen auf deren Fähigkeit beruht, durch zusätzlich ausgelöste Rezeptoraggregation weitere Signalwege zu initiieren, die letztendlich neben der NF κ B-Aktivierung auch zu hohen Mengen IFN- α führen.

4.2.5 TLR 9-Bindung einzelsträngiger ODN 2216 während der endosomalen Azidifizierung

ODN 2216 ist chimär aufgebaut, neben PTO-modifizierten 5'- und 3'-Enden liegt das für die Wirkung wichtige CpG-reiche Zentrum phosphodiestergebunden vor. Rutz et al. wiesen nach, dass Sequenzen, die Phosphodiesterbindungen enthielten, sequenz- und pH-abhängig an TLR 9 banden. Darüber hinaus mussten die ODN für diese Bindung einzelsträngig und unmethyliert vorliegen, die Duplices und C5-methylierten Analoga wurden nicht gebunden. Durch Chloroquin und Quinacrin konnte das Ansäuern des Endosoms und zugleich die CpG-TLR 9-Interaktion geblockt werden - ein sicheres Zeichen, dass der endosomal- und lysosomal verliegende pH 6-5 einen wichtigen Einfluss auf die Bindungen hat [Rutz et al. 2004]. Da ODN 2216 als ein Gemisch höhermolekularer Strukturen vorliegt, war es ein wichtiger Aspekt der Struktur-Wirkungsanalyse, den Einfluss eines sinkenden Umgebungs-pHs auf die Stabilität dieser Strukturen zu untersuchen.

Betrachtet man die Wasserstoffbrücken-bildenden funktionellen Gruppen der Guanine, so fällt auf, dass alle einen ausgesprochen starken Basencharakter haben (Abbildung 27, $pK_s = 10,7$ bei dem N7 und $pK_s = 9,4$ bei dem N1 und bei der Aminogruppe). Bei $pH < 6$ werden sie sukzessive protoniert und dementsprechend die Hoogsteen-Bindungen gelöst. Dadurch verlieren die G-Tetraden ihren stabilen Aufbau und aus größeren Multimeren werden kleinere bis hin zum Einzelstrang freigesetzt (Abbildung 10).

Interessanterweise liegt das Bindungsoptimum für TLR 9-CpG bei pH 6-5,5; bei pH 7 bindet CpG nicht [Rutz et al. 2004]. Die Tatsache, dass ODN 2216 die Bindungen bei $pH < 6$ löst, könnte nicht nur eine Einzelstrangbindung an TLR 9 auch für dieses ODN belegen, dessen CpG-haltiges Zentrum keine PTO-Modifikation besitzt. Die Azidifizierung der Endosomen würde darüber hinaus durch die Auftrennung multimer-vorliegender Strukturen eine notwendige Voraussetzung für TLR 9-CpG-Bindungen und damit für die Wirksamkeit von CpG-A darstellen.

4.2.6 Interpretation der geringen B-Zell-Aktivierung durch CpG-A

Bisher wurde angenommen, dass die geringe Wirkung von ODN 2216 auf B-Zellen auf der Existenz großer partikulärer Strukturen beruht, welche sich in diesem Falle hinderlich auswirken. Interessanterweise werden B-Zellen aber auch durch die nach entsprechender Temperatur-Präinkubation überwiegend monomer oder als kleine Partikel vorliegenden ODN 2216 nicht aktiviert. Auch deren Transfektion mit Poly-L-Arginin führt zu keiner Verbesserung (Abbildung nicht gezeigt). Eine verminderte Aufnahme in die Zellen scheidet somit als Grund für die mangelnde Aktivität bei CpG-A aus. Dies wird durch Studien zu Bindung und Aufnahme der beiden CpG-Klassen A und B in B-Zellen bestätigt, die für CpG-A zwar eine verstärkte Bindung und Aufnahme jedoch zugleich nur eine minimale Aktivierung der B-Zellen nachwiesen [Gursel et al. 2002]. Auch die vorherige Aktivierung der B-Zellen mit IFN- α führt zu keiner Wirkungssteigerung der monomer oder als kleine Partikel vorliegenden ODN (Abbildung nicht gezeigt). Offensichtlich bestehen für eine optimale B-Zell-Aktivierung vor allem Anforderungen an die Sequenz und Länge der ODN, insbesondere frei zugängliche 5'-TCGTCGTT-Enden, welche in den aktiven ODN M362 und 2006 vorhanden sind. Wegen der flankierenden Poly-G-Sequenzen sind die CpG-Motive bei ODN 2216 für eine Erkennung offenbar nicht zugänglich.

4.3 Das Palindrom als zentrales Element in den Struktur-Wirkungsbeziehungen von ODN M362 (CpG-C)

4.3.1 Eigenschaften Palindrom-basierter Strukturen von ODN M362

Betrachtet man die Sequenz von ODN M362, so fällt auf, dass sich aufgrund der spezifischen Basenfolge der das Palindrom flankierenden Sequenzen theoretisch sogar mehrere Duplices bzw. Hairpins bilden können. Diese Eigenschaft zeichnet ODN M362 gegenüber anderen Palindromsequenzen aus. Allein aus thermodynamischer Sicht müssten sich alle in Abbildung 28 angeführten Duplices und Hairpins bilden, wobei diese Berechnungen für Raumtemperatur durchgeführt wurden.

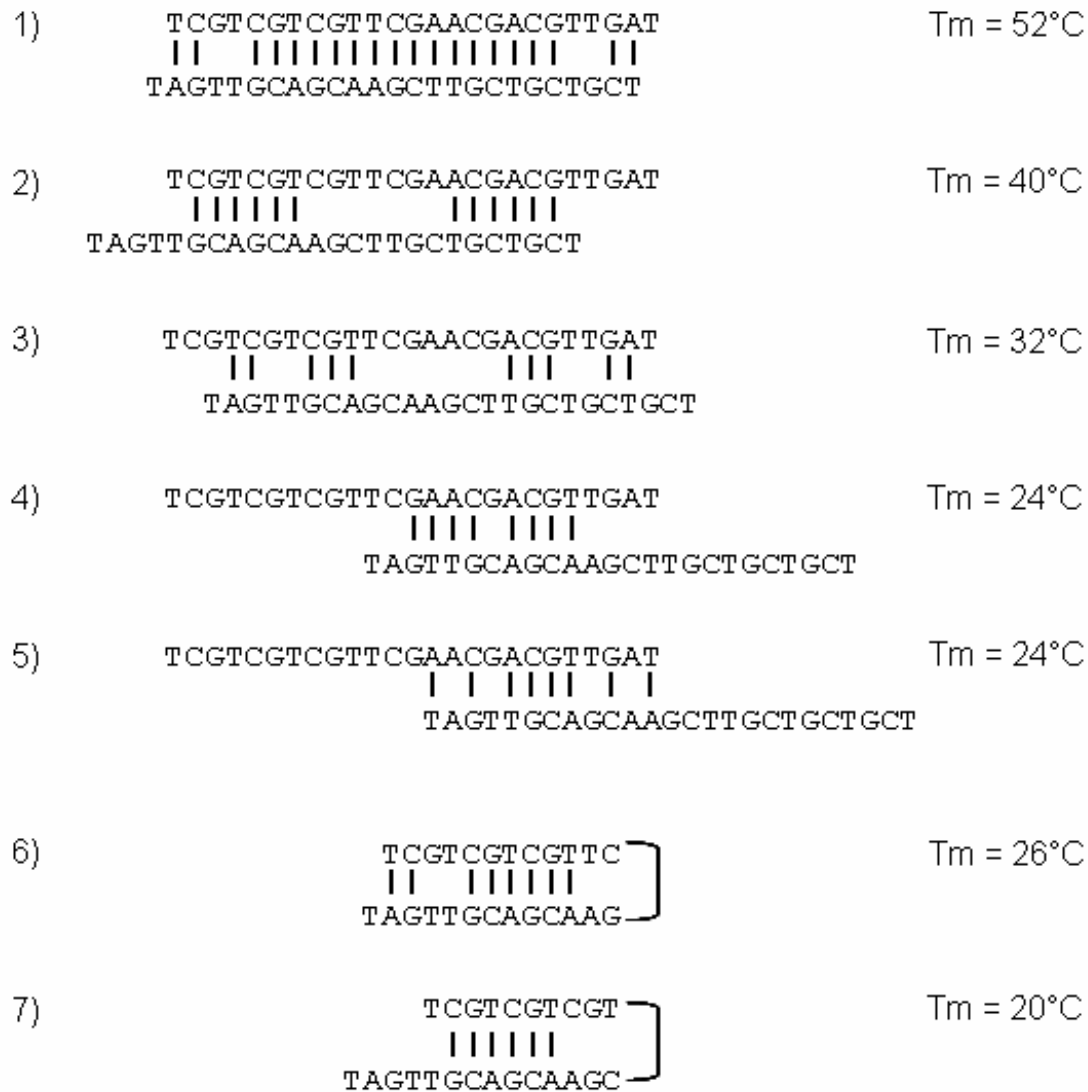


Abbildung 28: Hypothetische Modelle der Duplices und Hairpins von ODN M362

Es wurden alle Formationen mit $\Delta G < -5,0 \text{ kcal/mol}$ (als thermodynamisch wahrscheinlichste) ausgewählt. (G = freie Enthalpie, Berechnung nach Gibbs-Helmholtz)

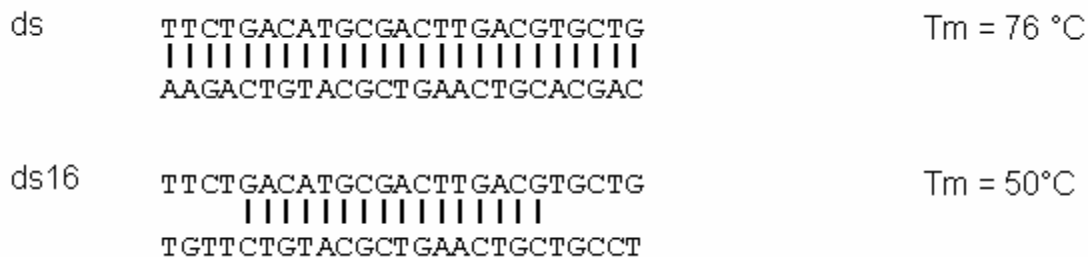


Abbildung 29: Duplexkontrollen für ODN M362

Die Duplexkontrollen ,ds' und ,ds16' wurden aus ,ss/F' und ,ss/rw' bzw. ,ss/F' und ,ss/16rw' (2.2.2) durch wie in 2.2.4 beschriebenes Erhitzen und Abkühlen auf Raumtemperatur generiert.

Eine näherungsweise Berechnung der Schmelztemperaturen (T_m) zeigt allerdings, dass nur die Duplices 1 und 2 bei 37 °C stabil sein könnten (Faustformel: C-G = 4 °C, A-T = 2 °C). Diese Berechnungsmethode gilt für DNA-ODN und gibt näherungsweise die Schmelztemperatur an. Die Sequenz von ODN M362 ist außerdem komplett Phosphorothioat(PTO)-modifiziert. Dies bietet den Vorteil einer höheren Stabilität gegenüber Endonukleasen und zeigt eine zusätzliche Wirkungssteigerung bei CpG-ODN. Allerdings wird durch die Substitution eines Sauerstoffs gegen ein Schwefelatom nun in der Phosphatgruppe ein Chiralitätszentrum geschaffen, welches weniger die strukturellen, sondern vor allem die energetischen Eigenschaften von DNA-Duplices beeinflusst. Auch wenn sich R-konfigurierte Schwefelatome nun in der großen Furche (*major groove*) der Helix befinden, liegen sie dort weit genug von anderen Atomen entfernt und können deren Reaktivität trotz ihres größeren van-der-Waals-Radius (1,8 Å verglichen mit 1,5 Å beim Sauerstoff) nicht stören. Daher können sie keine strukturellen Veränderungen auslösen. Die unterschiedlichen energetischen Eigenschaften führen jedoch zu einer Verringerung der Schmelztemperaturen [Hartmann et al. 1999]. Durch die PTO-Modifikation könnten die Duplices Nr. 1 (T_m = 52 °C) und Nr. 2 (T_m = 40 °C) demnach thermodynamisch instabiler geworden sein, so dass bei 37 °C vermutlich nur Duplex Nr.1 stabil ist (Abbildung 28).

4.3.2 Differenzielles Verhalten Palindrom-basierter Duplices im physiologischen Milieu: Aktivität trotz Strukturlabilität

Um Rückschlüsse auf die tatsächlichen Strukturbildungen und deren Stabilität *in vivo* ziehen zu können, wurden die ODN und entsprechende Kontrollsequenzen bei 37 °C und physiologischen Na^+ -Konzentrationen gelelektrophoretisch analysiert. Durch Verwendung eines modifizierten Gels (siehe auch: Material und Methoden 2.1.7.2, S.24) wurde die Simulation physiologischen Milieus komplettiert. Die zum Vergleich durchgeführte Elektrophorese bei 4 °C ermöglichte die Unterscheidung zwischen den möglichen und den tatsächlich *in vivo* vorhandenen Strukturen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hairpins nicht nur bei 37 °C sondern auch bereits bei 4 °C nicht gebildet werden (Abbildung 13, S.65).

In diesem Fall weicht das tatsächliche Verhalten von den thermodynamischen Berechnungen (Abbildung 28) ab: Die Doppelstränge bilden sich zwar zunächst in geringem Maße (bei 4 °C) aus, sie sind jedoch bei 37 °C nicht mehr stabil. Bei Anwesenheit von Mg^{++} Ionen anstelle der Na^{+} Ionen ist ein größerer Anteil Duplices bei 4 °C stabil; dieser Effekt hat jedoch keinen Einfluss auf das Verhalten bei 37 °C. Auch wenn sich also der M362-Duplex Nr. 1 bildete, würde er demnach im physiologischen Milieu trotz seiner berechneten (höheren) Schmelztemperatur nicht lange stabil sein.

Diese Eigenschaft scheint auf dem Palindrom zu beruhen. Der Kontroll-Duplex ,ds16' (Abbildung 29), welcher aus zwei in 16 zentralen Basen komplementären Einzelsträngen generiert wurde, simulierte in den Experimenten einen M362-Doppelstrang ohne Palindrom. Zusätzlich waren die Purin- und Pyrimidinbasen im gleichen Verhältnis wie bei M362 vorhanden, es konnte also von entsprechenden Bindungsstärken und Schmelzpunkten ($T_m = 50$ °C bei ,ds16' sowie $T_m = 52$ °C bei Duplex Nr.1, Abbildung 28) ausgegangen werden. ,ds16' zeigte zwar ähnliche Tendenzen bezüglich der Na^{+} - und Mg^{++} -Einflüsse, jedoch waren bei 4 °C und bei 37 °C jeweils gleich hohe Mengen als Doppelstrang stabil (Abbildung 12, Seite 64). Der Duplex Nr.1 hat 20 komplementäre Basen und hätte rein rechnerisch bei 37 °C ebenfalls stabil sein müssen. Möglicherweise hat das Palindrom also zusätzlich zu der PTO-Modifikation einen destabilisierenden Einfluss auf den Duplex. Folglich erscheint die Stabilität bei zusätzlich niedrigen endosomalen pH-Werten und eine darauf basierende Rolle bei der bei der TLR 9-Erkennung unwahrscheinlich.

Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung von Jason Marshall et al. unterstützt diese Hypothese. Die Verwendung eines nur leicht variierenden Natrium-Puffers (150 mM NaCl/10 mM Na_3PO_4) zum Lösen der ODN macht deren Ergebnisse mit den strukturellen Analysen dieser Arbeit vergleichbar. Es wurden Klasse C ODN mit verschiedenen langen Palindromen bei 37 °C und bei pH 7 oder pH 5 präinkubiert und das jeweilige Verhältnis der Duplices zu Monomeren bestimmt. Ein mit der Sequenz von ODN M362 vergleichbares Klasse C ODN (C274, 12 Basen Palindrom, 21 Basen Länge) zeigte in einer untersuchten Konzentration von 4 µg/ml bei pH 7 ein Verhältnis von 12/88 % (ds/ss) und lag bei pH 5 zu 100 % als Einzelstrang vor [Marshall et al. 2005].

Basierend auf diesen Überlegungen wurde erwartet, dass eine Übertragung der Ergebnisse der strukturellen Untersuchung in den Zellversuch möglich ist. Wenn ein Doppelstrang aufgrund seiner bei physiologischen Bedingungen ungenügenden Stabilität keinen Einfluss auf die Aktivierung der Zellen hat, darf eine vorherige Temperatur-Präinkubation des ODN bei 95 °C keine unterschiedlichen Ergebnisse gegenüber einer unbehandelten ‚Positivkontrolle‘ hervorrufen. In Bezug auf die B-Zell-Aktivierung werden diese Erwartungen bestätigt (Abbildung 14, Seite 66). Offenbar wirkt sich die Existenz von Sekundärstrukturen bei M362 weder negativ noch positiv auf die B-Zell-Erkennung aus, solange ein freies 5'-TCG-Ende und eine ausreichende Länge des ODN vorhanden ist. Bei den PBMCs werden dagegen widersprüchliche Ergebnisse erzielt (Abbildung 14, Seite 66). Wird das ODN vor dem Zellversuch auf 95 °C erhitzt und somit die möglichen Sekundärstrukturen gelöst, so ist die IFN- α Induktion in PDCs gegenüber der ‚Positivkontrolle‘ signifikant um fast 50 % reduziert ($p = 0,019$). Die ODN, welchen durch *Annealing* bis 4 °C ein optimales Zusammenlagern ihrer Duplexanteile ermöglicht wurde, induzieren vergleichbar viel IFN- α wie die ‚Positivkontrolle‘. Daraus ist zu folgern, dass Doppelstränge in diesen Bedingungen vorhanden und an der Wirkung beteiligt sind.

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Marshall et al. in ihren Experimenten. Sie bestimmten bei den CpG-C ODN mit verschiedenen langen Palindromen nicht nur die Verhältnisse der Duplices zu Monomeren, sondern verglichen diese auch mit der Wirkung auf PDCs und B-Zellen. Längere Palindrome (18, 22, 28 Basen) bedeuteten höhere Anteile an Duplices und dies korrelierte direkt mit einer höheren IFN- α Induktion in PDCs. Dagegen waren die Länge des Palindroms und der damit höhere Anteil Duplices für die B-Zell-Aktivierung unerheblich.

Ein weiterer wichtiger Befund dieser Untersuchungen war, dass die Bildung von Duplices der Sequenz von ODN 2006 (CpG-B) durch Entwurf eines geeigneten Gegenstranges zu keiner Steigerung der ursprünglich schwachen Aktivität in Bezug auf IFN- α führte [Marshall et al. 2005]. Es ist daher denkbar, dass die Induktion von IFN- α durch CpG-C nicht ausschließlich auf der Existenz von Doppelsträngen beruht, auch wenn diese den Effekt verstärken. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Zerstörung der Sekundärstrukturen die Aktivität nur um 50 % und nicht vollständig reduziert (Abbildung 14, Seite 66).

Hieraus ergibt sich die Frage, ob es neben dem Palindrom noch andere Sequenzmerkmale gibt, die die funktionelle Aktivität beeinflussen. In der in Abbildung 30 aufgeführten Liste der bereits publizierten CpG-C-Sequenzen wurde ihre jeweilige Wirkung auf das Klasse C ODN C274 bezogen (= 100 %). Ziel war es, die Gemeinsamkeiten der besonders potenten Sequenzen durch den groben Vergleich der jeweiligen Wirkprofile erkennbar machen.

Das interessante Ergebnis dieser Auswertung ist jedoch, dass bei Einhaltung der drei Voraussetzungen für die Klasse C – ein freies 5'-TCG-Ende, mehrere CpG-Motive innerhalb einer mindestens 12 Basen langen palindromischen Sequenz und ein komplett PTO-modifiziertes Rückgrat – alle Anforderungen für die charakteristischen Wirkungen erfüllt werden. Die Basenfolge des freien 3'-Endes scheint ebenso wie die Art der die CpG-Motive flankierenden Sequenzen eine untergeordnete Bedeutung zu haben, solange hier ein 1-3 Basen Abstand zu den Motiven eingehalten wird. Auch die Position des Palindroms spielt offenbar eine eher unwichtige Rolle. Eine Mindestlänge von 12 Basen bei dem CpG-reichen Palindrom scheint dagegen die Voraussetzung für eine gute Aktivität darzustellen. Je länger und CpG-reicher das Palindrom ist, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die gebildeten Duplex-Formationen trotz der PTO-Bindungen im physiologischen Milieu länger stabil sind (Cytosin/Guanin bilden bei der Watson-Crick-Basenpaarung drei lineare Wasserstoffbrücken, dagegen bilden Adenin/Thymin nur zwei Wasserstoffbrücken aus). Dies ist in Einklang mit den Beobachtungen von Marshall et al., die zeigen konnten, dass ein höherer Anteil Duplices mit einer höheren Aktivität korrelierte.

Dem widerspricht jedoch, dass die Sequenz von ODN 2006 (CpG-B) weder als Monomer noch als Duplex IFN- α induziert, obwohl sie zwei der drei Voraussetzungen für die Klasse C (freies 5'-TCG-Ende und PTO-Rückgrat einer CpG-reichen Sequenz) erfüllt und neben B-Zellen auch PDCs aktivieren kann. Der Schlüssel für die Erklärung der hohen IFN- α Induktion durch CpG-C bei PDCs liegt möglicherweise in der (palindromischen) Sequenz selbst.

ODN	Sequenz	Basen	Palindrom	%IFN- α	%B-Zellaktiv.
C631	TCGTCGAAACGTTTCGACAGT	21	16	200%	95%
C642	TCGT <u>CGCGCGCGCGAGATGAT</u>	21	12	175%	30%
C630	TCGACGT <u>CGACGTCGACGTAT</u>	21	16	175%	75%
C593	TCGT <u>CGAGCGCTCGAGATGAT</u>	21	12	170%	78%
C644	TCGT <u>CGCCCGGGCGAGATGAT</u>	21	12	145%	45%
C646	TCGT <u>CGTTCGAACGAGATGAT</u>	21	12	125%	82%
M362	TCGT <u>CGTCGTTTTCGAACGACGTTGAT</u>	25	16	125%	120%
C640	TCGT <u>CGGGCGCCCGAGATGAT</u>	21	12	120%	47%
C583	<u>TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT</u>	22	20	115%	85%
M358	TCGT <u>CGTTGTTCGACGATCGTCGATGAT</u>	27	14	115%	85%
C594	TCGT <u>TCGATCGATCGAGATGAT</u>	21	12	110%	83%
M387	TCGT <u>CGTCGTTTCGAACGACG</u>	20	16	105%	k.A.
C274	TCGT <u>TCGAACGTTTCGAGATGAT</u>	21	12	100%	100%
C582	<u>TTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT</u>	23	22	99%	105%
M361	TCGT <u>CGTTGTTCGTTTCGAACGACGTTGAT</u>	28	14	99%	105%
M354	TCGT <u>CGTTTTGTTCGAACGTTTCGAGATGAT</u>	29	12	98%	98%
C595	TCGT <u>CGGTTCGACCGAGATGAT</u>	21	12	85%	80%
M356	TCGT <u>TCGACGATCGTCGATGAT</u>	21	14	85%	90%
M388	TCGT <u>CGTCGTTTCGAACGACGTCGTT</u>	25	16	80%	k.A.
M386	TCGT <u>CGTCGATCGTACGACGTTGAT</u>	25	6 bzw 6	62%	k.A.
M385	TCGT <u>CGTGCTTCGAAGCAGCTTGAT</u>	25	16	60%	k.A.
M357	TCGT <u>CGTCGTACGACGATGAT</u>	21	14	50%	80%
M355	TCGT <u>CGTTTCGAACGAGATGAT</u>	21	12	45%	108%
C633	TCGT <u>CGAAAACGTTTTTCGAGAT</u>	22	16	40%	90%
M384	TGCT <u>CGTCGTTTCGAACGACGTTGAT</u>	25	16	40%	k.A.
M353	TCGT <u>CGTTGTTCGAACGTTTCGAGATGAT</u>	27	12	18%	107%
2006	TCGT <u>CGTTTTGTTCGTTTTGTTCGTT</u>	24	0	5%	110%
C661	<u>TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA</u>	20	20	0%	2%
M383	TGCT <u>GCTGCTTGCAAGCAGCTTGAT</u>	24	16	0%	25%

Abbildung 30: Vergleich publizierter CpG-C Sequenzen [Hartmann et al. 2003; Marshall et al. 2003] und ODN 2006 (CpG-B)

4.3.3 Palindrom-basierte (Einzelstrang-) Effekte?

Auch wenn das Palindrom die Bildung von Duplices ermöglicht, muss aufgrund der verfügbaren Daten angenommen werden, dass im endosomalen pH bei 37 °C nur noch Einzelstränge von ODN M362 vorliegen. Rutz et al. wiesen für PTO-modifizierte CpG- und GpC-ODN eine gleichermaßen unspezifische Bindung an TLR 9 nach [Rutz et al. 2004]. Eine TLR9-abhängige Zell-Aktivierung konnte sogar für PTO-modifizierte und kein CpG-Motiv enthaltende ODN gezeigt werden. Der Effekt war vor allem davon abhängig, wie gut diese dennoch in die Bindungstasche des TLR 9 passten

[Roberts et al. 2005]. Auch in den Arbeiten von Latz et al. wurde eine direkte und sequenzunabhängige Bindung PTO-modifizierter CpG-ODN an TLR 9 gezeigt. Diese Untersuchungen wurden mit CpG-B gemacht. Nicht-stimulative GpC-ODN konnten zwar an TLR 9 binden, lösten aber keine Aktivierung aus. Durch Zugabe steigender Konzentrationen dieser inaktiven Sequenzen konnte die CpG-bedingte NF κ B Aktivierung gesenkt werden. Beide Sequenzen konkurrierten folglich konzentrationsabhängig um die TLR 9-Bindung [Latz et al. 2004].

Die Tatsache, dass CpG-C in PDCs zwar deutlich größere Mengen IFN- α als CpG-B induziert, jedoch eine schwächere Expression kostimulatorischer Moleküle auslöst, kann - setzt man eine gleiche Bindung beider PTO-Sequenzen an TLR 9 voraus - mit unterschiedlichen Modelle erklärt werden:

- Die CpG-reiche Palindrom-Sequenz von CpG-C könnte eine stärkere Bindung an TLR 9 ermöglichen und dadurch weitere Aktivierungsmechanismen initiieren. Die Maßgabe an eine aktive Klasse-C Sequenz, dass 1-3 Basen Abstand zwischen den CpG-Motiven liegen sollten, könnte auf ein besonders gutes räumliches „Passvermögen“ in die TLR 9-Bindungstasche hinweisen. Ebenfalls vorstellbar wäre, dass das Palindrom eine Selbst-Stabilisierung des ODN im Rezeptor ermöglicht. Eine Rückfaltung der Sequenz unter Bildung einer Hairpinformation könnte nicht nur eine stärkere sondern vor allem eine längere Bindung an TLR 9 gestatten.
- Eine weitere Erklärung liegt in der Möglichkeit, dass ein bisher unbekannter Erkennungsmechanismus für Palindrome existiert. Die Anzahl von Palindromen im bakteriellen Genom ist deutlich höher als man zunächst angenommen hatte [Lillo et al. 2002]. Ein evolutiv entwickelter Erkennungsmechanismus für unmethylierte CpG-enthaltene Palindromsequenzen, welcher in die erhöhte Sekretion des antiviralen Zytokins IFN- α mündet, ist bei Vertebraten in diesem Zusammenhang vorstellbar und sinnvoll. Hierbei darf nicht übersehen werden, dass die Entdeckung immunstimulatorischer CpG-Motiven ursprünglich auf CpG-enthaltenden palindromischen Sequenzen beruhte [Yamamoto et al. 1992a]. Tokunagas Arbeitsgruppe vermutete, dass ein Palindrom notwendig sei, um sekundäre Strukturen wie z. B. *stem loops* zu bilden und dem Vertebratenorganismus als Erkennungsstrukturen zu dienen [Tokunaga et al. 1988]. Die Entdeckung von Krieg et al., dass auch nicht-palindromische CpG-Sequenzen (wie CpG-B) zu einer Immunaktivierung führen [Krieg et al. 1995], schränkt diese Hypothesen

möglicherweise gar nicht ein, sondern basiert auf den parallel dazu existierenden spezifischen CpG-Erkennungsmechanismen (über TLR9).

4.4 Design immunstimulatorischer Partikel unter Einsatz wirksamer Strukturelemente von CpG-A und CpG-C

Die Aggregation freier Nukleinsäuren ist ein schwer vorhersagbarer und – wie in dieser Arbeit gezeigt – einigen Einflüssen unterliegender Prozess. Bei CpG-A und CpG-C bestehen zum Teil starke Abhängigkeiten zwischen der Di- bzw. Multimerisierung und den anwesenden Ionen im umgebenden Medium. Dies macht den genauen Aufbau der Strukturen schwer vorhersehbar und schlecht standardisierbar in Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz. Zentraler Ansatzpunkt dieser Arbeit sind die Gemeinsamkeiten beider Klassen: Die Existenz eines Palindroms innerhalb ihrer Sequenz, die Fähigkeit zu aggregieren und die hohe Induktion von IFN- α in PDCs. Vorteilhaft erscheint es aus oben genannten Gründen, die Hoogsteen-Bindungen der G-Tertraden des Klasse A ODN zum Partikel Aufbau durch kovalente Bindungen ersetzen zu können und dabei weiterhin die stabilisierende Wirkung eines Palindroms zu nutzen. Ein freies 5'-Ende mit CpG Motiv scheint für eine immunstimulatorische Wirkung Voraussetzung zu sein. Die Gruppe um S. Agrawal konnte nachweisen, dass die Aktivität zweier stimulatorischer ODN gesteigert wurde, nachdem sie am 3'-Ende miteinander verbunden worden waren. Wurden sie mit ihren 5'-Enden verknüpft, so verloren sie den Effekt [Kandimalla et al. 2002; Yu et al. 2002].

Auf Basis der in unserer Arbeitsgruppe favorisierten Theorie des Rezeptor-*crosslinkings* für eine besonders starke immunstimulatorische Potenz wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Rosenberg (*Academy of Sciences*, Prag) bi- und trivalente Alkylamingrundgerüste entwickelt (Tabelle 7). Diese bieten die Möglichkeit, zwei oder drei Nukleinsäuren zu binden. Aufgrund seines interessanten Aktivierungsprofils fiel die Wahl auf das Palindrom-ODN der Klasse C (Sequenz 2, ODN M362). Als nicht-palindromische Kontrollsequenz wurde 5'-TCGTCGTT-3' (Sequenz 1) gewählt. Dieses enthält das optimale humane Motiv (5'-GTCGTT-3'; [Hartmann und Krieg 2000]) und ist im 5'-Endmotiv von ODN M362 und dreifach in der Sequenz von ODN 2006 enthalten.

4.4.1 Interpretation der strukturellen Analyse

Die Fähigkeit palindromischer DNA-Sequenzen, inter- und intramolekulare Bindungen auszubilden, stabilisiert den Partikel Aufbau von Klasse A ODN 2216. Daher ist zu erwarten, dass bei den Linkern, die Sequenz 2 enthalten, ebenfalls höhermolekulare Strukturen ausgebildet werden. Hier bieten die trivalenten Linker (PVL-B, PVL-D) im Gegensatz zu dem bivalenten Linker (PVL-F) die zusätzliche Möglichkeit, dreidimensionale Strukturen auszubilden. Die PVL, die nur die kurze Sequenz 1 (5'-TCGTCGTT-3') tragen, haben weniger paarende Basen zur Bildung von Bindungen zur Verfügung, somit ist zu erwarten, dass sie kaum oder gar keine Partikel bilden. Entsprechend dieser Hypothese bilden die PVL-A, -C und -E keine großen Strukturen (Abbildung 15, S.68). Dahingegen formieren sich bei PVL-B, -D und -F größere Partikel, die im Gel retardiert werden. Bei PVL-B und -D sind diese vermutlich so groß, dass sie größtenteils in der Geltasche verbleiben und kaum im Gel wandern.

Eine andere Erklärung für das geringe Wandern der Strukturen im Gel liegt in der Vorstellung, dass es je verzweigter die Partikel werden (siehe auch Abbildung 31) umso mehr Möglichkeiten gibt, sich in der Vernetzung des Gels zu verhaken – und dies eher unabhängig von der tatsächlichen jeweiligen Größe der Strukturen. Weder die Reptationstheorie noch der Ogston-Siebeffekt als Modellvorstellungen zum Wanderungsverhalten von Nukleinsäuren im elektrischen Feld werden dieser Trennung nach „Verzweigungsgrad der Partikel“ gerecht (siehe auch 2.5.1.1: Prinzip der Gelelektrophorese, S.41).

Da PVL-F zwei palindromische DNA-Sequenzen enthält, bietet sich nur die Möglichkeit, lineare Partikel aufzubauen. Dennoch bilden sich hier Strukturen, die in gleiche Laufhöhe wandern wie ODN 2216 als Kontrolle und ein trotz des unterschiedlichen strukturellen Aufbaus sehr ähnliches Bild auf dem Gel ergeben.

4.4.2 Modelle der durch die palindromischen Nukleinsäuren ermöglichten Multimerisierungen trivalenter Linker

Die nachgewiesene Labilität des PTO-Palindroms von ODN M362 kann durch die bi- oder trivalenten Grundgerüste als strukturaufbauendes und stabilisierendes Element offensichtlich kompensiert werden. Die trivalenten Linker ermöglichen die zufällige, variierende Zusammenlagerung der palindromischen Nukleinsäuren in drei Richtungen des Raumes und dadurch die Bildung großer, dreidimensionaler Partikel. Chemisch betrachtet handelt es sich hier um hochverzweigte Polymere. Je trivalentem Linker und dessen zentralem Kohlenstoffatom, welches bei 4 nicht-Wasserstoffresten eine tetraedrische Konformation einnimmt, werden durch die freie Drehbarkeit der Kohlenstoffketten drei Richtungen im Raum an Bindungsstellen ermöglicht. Dadurch können sich netzartige oder sternförmig aufgebaute partikuläre Strukturen von enormer Größe und Heterogenität bilden (Abbildung 31).

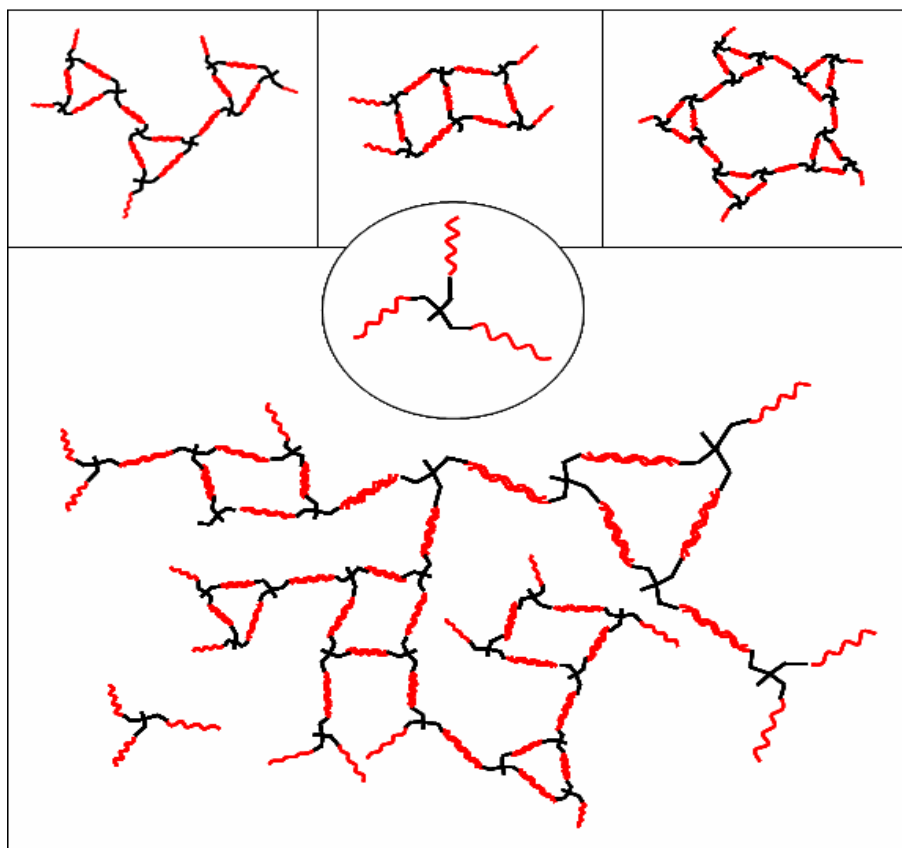


Abbildung 31: Modelle der durch die palindromischen Sequenzen ermöglichten Multimerisierungen trivalenter Linker (PVL-B, PVL-D, PVL-RNA)

4.4.3 Differenzielles Aufnahmevermögen für große Partikel bei plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen

Die trivalenten Linker, die palindromische CpG-DNA enthalten (PVL-B, PVL-D), multimerisieren erwartungsgemäß zu sehr großen partikulären Strukturen (Abbildung 15, Seite 68). Der Größenbereich liegt deutlich oberhalb von ODN 2216, dessen mittlere Partikelgrößen bei 24-40 nm liegen (Abbildung 2, Seite 50). Diese Strukturen sind paradoxerweise im Gegensatz zu ODN 2216 sehr potent in Bezug auf B-Zell-Aktivierung, induzieren jedoch nur geringe Mengen IFN- α , welches als Maß für die PDC-Aktivierung verwendet wird. Eine partikuläre Struktur von CpG-DNA scheint sich demnach weder ungünstig auf die B-Zell-Erkennung noch besonders günstig auf die PDC-Aktivierung auszuwirken, wie bisher bei dem Vergleich der Aktivierungsprofile von CpG-A und CpG-B angenommen wurde.

Eine Erklärung für diese Beobachtung liegt möglicherweise in den unterschiedlichen Größen der Zellen, die deren Aufnahmevermögen limitieren. PDCs sind mit ca. 6 μm Durchmesser deutlich kleiner als Lymphozyten (10 – 15 μm) [Kohrgruber et al. 1999]. Die aus den PVL gebildeten Partikel verbleiben im Gegensatz zu ODN 2216 weitgehend in der Geltasche. Vorstellbar wäre, dass die Partikel zu groß sind und nicht in die PDCs aufgenommen werden können. Die geringe Induktion von IFN- α wäre durch die Aufnahme weniger, kleinerer Strukturen erklärbar. Die B-Zellen können dagegen ein größeres Spektrum an Partikelgrößen aufnehmen und werden von diesen aktiviert. Dass Sekundärstrukturen von CpG-C keinen Einfluss auf die B-Zell-Aktivierung haben, wurde bereits in 3.1.2.3 gezeigt; dies wird nun auch für Tertiärstrukturen bestätigt, die auf CpG-C basieren. Monomere und kleine Partikel von ODN 2216 aktivieren B-Zellen jedoch ebenso wenig wie die größeren Strukturen. Gursel et al. zeigten, dass auch CpG-A in B-Zellen aufgenommen wird [Gursel et al. 2002], daher muss die Wirksamkeit der PVL-Partikel im Vergleich zu ODN 2216 auf den im endosomalen Milieu frei zugänglichen 5'-TCGTCGTT-Motiven der M362-Sequenzen beruhen (siehe auch 4.2.6). Die kurzen, in den Kontroll-PVL (A, C, E) präsentierten 8mer Motive (5'-TCGTCGTT) aktivieren B-Zellen nicht. Die Tatsache, dass dies auch durch Transfektion nicht verbessert werden kann, unterstützt die Annahme, dass in diesen Zellen wirksame Sequenzen eine gewisse Länge besitzen müssen.

PVL-F bildet aufgrund des bivalenten Grundgerüsts nicht so große Strukturen wie z. B. PVL-B und zeigt auf dem Gel nahezu identische Laufhöhen wie ODN 2216. Dennoch induzieren diese Partikel nur schwach IFN- α in PBMCs. Eine Erklärung läge in der differenziellen Aufnahme von CpG-A über Scavenger-Rezeptoren oder andere Poly-G-spezifischen Mechanismen, die die PVL-Partikel nicht nutzen können.

4.4.4 Verbesserte Aufnahme oder wirkungssteigernde Umlagerungen durch Poly-L-Arginin?

Auf den möglichen Einfluss der Poly-L-Arginine auf die Strukturbildung wurde in 4.1 hingewiesen. Es ist vorstellbar, dass die differenziellen Ladungsverhältnisse eine Umlagerung der sehr großen Partikel (PVL-B, -D) zu kleineren, energetisch günstigeren oder zu wirkungsvolleren Strukturen bewirken, in denen die stimulatorischen Sequenzen besser präsentiert werden. Die verstärkte Wirkung der Partikel nach Präinkubation mit Poly-R würde diese Vermutung unterstützen. Der Effekt von PVL-B auf B-Zellen wird im Verhältnis zu der Wirkung auf PBMCs deutlicher gesteigert, da diese Zellen eine höhere Bandbreite an Partikelgrößen aufnehmen können, viele dieser Komplexe aber vermutlich immer noch zu groß für PDCs sind. Dagegen spricht, dass eine Präinkubation mit Poly-L-Arginin keinen Einfluss auf die Aktivität von ODN 2216 bei PDCs hat. Eine polykationbedingte Umlagerung oder Auftrennung dieser Partikel ist fraglich, da kleinere Strukturen kaum IFN- α induzieren. Selbst wenn der Grund für die gezeigte schwache Wirkung kleiner 2216-Partikel in einer verminderten Aufnahme liegt, ist unwahrscheinlich, dass eine Transfektion dies unabhängig von den verwendeten Poly-Rs derart kompensieren kann, dass die Aktivität gleich bleibt. Da der Partikelaufbau von ODN 2216 jedoch auf anderen Grundlagen basiert, kann der mögliche Einfluss der Polykationen nur schwer verglichen werden.

Die PVL, die bi- und trivalent kurze 8mer Motive enthalten und keine Strukturen bilden, sind nicht aktiv (PVL-A, -C und -F). Nach Transfektion mit Poly-L-Arginin induzieren sie dagegen vergleichbar große Mengen IFN- α in PDCs wie ODN 2216 (Abbildung 20, S. 73). Ob die Polykationen nur die Aufnahme in die Zellen verbessert haben oder ob die Präinkubation mit Poly-L-Arginin zu einer Aufnahme- und Wirksamkeits-steigernden Vergrößerung geführt hat, kann auch für diesen Fall diskutiert werden. Für letzteres

spricht, dass die steigende Aktivität mit längeren Poly-L-Argininen korreliert. Interessanterweise wird die schwache Aktivität von ODN 2006 in Bezug auf IFN- α durch Transfektion mit längeren Poly-L-Argininen um bis zu 600 % gesteigert, obwohl sie nicht auf einer geringen Aufnahme beruht. Es wäre vorstellbar, dass eine polykationbedingte ‚knäuelartige‘ Struktur der Monomere ein *Crosslinking* der Rezeptoren (wie in 4.2.4.2 für ODN 2216 vorgeschlagen) ermöglicht. Außerdem könnten für die hier gebildeten Protein-Nukleinsäure-Komplexe andere Erkennungsmechanismen existieren. Das 8mer Motiv ist als Sequenz ebenfalls allein nicht aktiv, induziert nach Transfektion vergleichbar viel IFN- α wie ODN M362 und verliert diesen Effekt, wenn die CpG-Motive durch GpC-Motive ersetzt werden. Trotz der Transfektionen beruht die Wirkung der PVL folglich mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem CpG-Effekt auf TLR 9. Ein letzter Nachweis könnte (im Maussystem) durch weitere Experimente mit TLR 9-*knock-out* -Mäusen erbracht werden.

4.4.5 Palindromische RNA als partikelaufbauendes Element

Es ist darüber hinaus grundsätzlich möglich, die Methode zum Partikel Aufbau aus trivalentem Grundgerüst und palindromischen Sequenzen auch mit entsprechenden RNA-Sequenzen anzuwenden. Die Multimerisierungen unterliegen ähnlichen Grundsatzmechanismen. Die Banden sind dabei deutlich schärfer abgesetzt, verlaufen aber auf ähnlicher Höhe wie bei ihrem DNA-Analogon (PVL-B). Auch hier verbleibt ein hoher Anteil der Partikel aufgrund der Größe in der Geltasche. Dennoch sind bei PVL-RNA deutlich mehr Partikel in den kleineren und mittleren Größenordnungen vorhanden (Laufhöhen ‚a‘ bis ‚b‘, Abbildung 22, Seite 76). Dies spricht für einen weniger stark ausgeprägten Aufbau sehr großer Partikel und die darauf basierende Existenz kleinerer und mittlerer Grundstrukturen. Diese Unterschiede in der Strukturbildung aufgrund des unterschiedlichen Bindungsverhaltens von DNA und RNA müssen bei dem Design der Ausgangsstrukturen bedacht werden. Mittels der auf diese Weise generierten RNA-Partikel kann nach Transfektion eine vergleichbar hohe Menge IFN- α in PMBCs induziert werden wie mit ODN 2216 (Abbildung 24, Seite 77). Die ss-Motiv-Erkennung bestimmter siRNA-Sequenzen (isRNA, immunstimulatorische RNA) über TLR 7 wurde bei PDCs von unserer Arbeitsgruppe bereits beobachtet. Es war jedoch nicht möglich, vergleichbar hohe Mengen IFN- α zu induzieren wie mit CpG-A [Hornung et al. 2005].

4.5 Ausblick

Ein wichtiger, den therapeutischen Einsatz von CpG-ODN limitierender Faktor ist die Stabilität und daraus resultierende Bioverfügbarkeit *in vivo*. Das einzige weltweit bisher zugelassene therapeutische ODN ist Formivirsen (Vitravene®), welches zur Behandlung der Zytomegalie-Retinitis bei AIDS-Patienten eingesetzt wird. Es muss lokal in den Glaskörper injiziert werden, da seine Halbwertszeit sonst zu kurz wäre. Die systemische Stabilität therapeutischer ODN zu erhöhen stellt die pharmazeutische Technologie vor Herausforderungen. Eine nahe liegende galenische Hilfe ist die Bindung von ODN an partikuläre Trägersysteme, wie z. B. Nanopartikel, Mikropartikel oder Liposomen. In diesem Zusammenhang konnte durch unsere Arbeitsgruppe für CpG-B und -C nach Adsorption an Nanopartikel eine Wirkungssteigerung in Bezug auf die IFN- α Induktion in PDCs nachgewiesen werden. Eine wesentlich elegantere Methode sind allerdings partikuläre Strukturen, die ausschließlich aus den immunstimulatorischen Nukleinsäuren aufgebaut sind und keiner weiteren Trägermaterialien bedürfen.

4.5.1 G-Tetraden-basierter Strukturaufbau immunstimulatorischer Partikel

- Mit Hilfe der Klasse A ODN ist es möglich, das antivirale Zytokin IFN- α in Mengen zu induzieren, wie es bislang nur mit Viren selbst möglich war. Es stellt ein heterogenes Gemisch sekundärer und tertiärer Strukturen dar, das sich aus einer variablen Anzahl von Einzelmolekülen zusammensetzt. Dynamische Umlagerungen dieser Strukturen verursacht durch äußere Einflüsse (wie z. B. Temperaturänderungen) erschweren die Standardisierung und Qualitätskontrolle dieser CpG-Klasse. Indem das Zusammenspiel der drei strukturstabilisierenden Elemente Palindrom, Poly-G und Kation herausgearbeitet wurde, können in Zukunft neue Leitlinien für den Einsatz von CpG-A, wie z. B. dessen Lösung in PBS statt in Aqua ad inj., erstellt werden.
- Es gilt zu testen, ob durch Substanzen, die sich in G-Tetraden anstelle der monovalenten Kationen einlagern, die biologische Stabilität Poly-G-basierter Partikel verbessert bzw. eine gezielte Freisetzung am gewünschten Wirkungsort ermöglicht werden kann. Ein für die klinische Anwendung besser stabilisiertes

CpG-A könnte wie ein Wirkstoff-Depot kontinuierlich hohe Mengen IFN- α induzieren. Es werden bereits einige Substanzen aus der Klasse der Anthraquinone und Porphyrine als innovative Krebsmedikamente getestet, welche in die G-Quadruplex-DNA von humanen Telomeren interkalieren, wodurch die Telomerase die Chromosomenenden nicht erreichen kann und die Zellteilung wieder begrenzt wird.

- Durch die in dieser Arbeit etablierte experimentelle Kontrolle der Multimerisierungen ist der gezielte Einsatz von Poly-G-Motiven als strukturaufbauendes Element ermöglicht worden. Ein weiterer Entwicklungsschritt wäre die Generierung von RNA/DNA-Hybrid-Partikeln, welche aus immunstimulatorischen palindromischen RNA-Sequenzen und flankierenden oder auch zentralen Poly-G-Motiven aufgebaut wären. In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits immunstimulierende ssRNA Sequenzen (isRNA, [Hornung et al. 2005]) als TLR 7-Liganden identifiziert werden. Mit Hilfe von isRNA und dsRNA können die TLR 3-, 7- und 8-tragenden und für eine Antitumor-Antwort so wichtigen myeloiden DCs (MDCs) aktiviert werden. Indem man mögliche Poly-G-abhängige Aufnahmewege der Zellen ausnützt und der RNA gleichzeitig eine partikuläre Struktur ähnlich eines RNA-Virus verleiht, könnte deren therapeutischer Einsatz weiter optimiert und von dem Einsatz von Transfektionsreagenzien unabhängig gemacht werden.

4.5.2 Palindrom-basierter Strukturaufbau immunstimulatorischer Partikel

Die Kombination palindromischer, immunstimulatorischer Sequenzen an einem Dreifach-Linker ist eine wirkungsvolle und vielseitig einsetzbare Methode zur Generierung höhermolekularer Nukleinsäurepartikel. Diese Technik ist nicht auf CpG-Motive in DNA begrenzt und kann auf andere für Viren charakteristische Nukleinsäuren wie dsRNA (Ligand für TLR 3) und ssRNA (bestimmte Basenzusammensetzung, Ligand für TLR 7 und TLR 8) übertragen werden.

- Zunächst sollten längere palindromische Sequenzen getestet werden, da von einer höheren Stabilität ausgegangen werden muss. Darüber hinaus ist auch in diesem Fall die Generierung von RNA/DNA-Hybriden oder reinen RNA-Partikeln ein

attraktiver Ansatzpunkt, um auch die MDCs aktivieren zu können. Auch der Einsatz von kurzen, nicht-palindromischen, immunstimulierenden Sequenzen war wirkungsvoll, daher sollten die isRNA-Sequenzen und dsRNA-Sequenzen an entsprechenden Mehrfach-Linkern getestet werden. Es wäre möglich, die immunologischen Profile von ssRNA, dsRNA und CpG in einem Partikel zu kombinieren und die Art der Immunantwort je nach Zusammensetzung der Partikel gezielt zu bestimmen.

- Ein weiterer Vorteil der PVL stellt die Existenz der Carboxylgruppe dar (in PVL-A, PVL-B), welche die zusätzliche Bindung eines Antigens ermöglicht. CpG-ODN sind vielversprechende Immunadjuvantien, da sie die Immunantwort in die gewünschte T_H-1 Richtung (IFN- γ , CTL, entsprechendes Ig-Profil) lenken [Chu et al. 1997]. Das Klasse-B ODN 2006, als Substanz für klinische Studien mit dem Namen CpG 7909 (ProMune®), weist eine ausgezeichnete Aktivität als Vakzine-Adjuvans in Primaten und beim Menschen auf. In den Mehrfachlinkern könnten mehrere dieser Sequenzen mit einem Antigen kombiniert werden. Diese Koadministration des Vakzineadjuvans (CpG) und Antigens in direkter räumlicher Nähe, sollte diesem eine optimale Immunogenität verleihen. In einem murinen Vakzinierungsmodell konnte dieser Effekt bereits durch Beladung eines Nanopartikels mit Tetanustoxoid und CpG nachgewiesen werden [Diwan et al. 2002]. Die Kombination von Antigen und Adjuvans in einem Partikel ohne Trägersubstanz wäre eine elegante Weiterentwicklung dieses Modells.

- Ein interessanter Ansatzpunkt aus chemischer Sicht wäre die Austitration der optimalen Mischungsverhältnisse Poly-L-Arginin zu PVL für eine maximale Zellstimulation bei gleichzeitiger Analyse der Strukturbildungen und der Einflüsse durch die Polykationen (siehe auch 4.1.2: Wahrscheinlichkeit von strukturellen Veränderungen der PVL-Partikel durch die Inkubation mit Poly-L-Arginin). Es sollte nicht nur das Zeta-Potenzial gemessen sondern vielmehr versucht werden, die Strukturen elektronenmikroskopisch darzustellen, um den Strukturaufbau besser verstehen zu können. Das ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscope*, Prozessrasterelektronenmikroskop) wäre eine geeignete Methode, da hier im Gegensatz zum TEM (Transmissionselektronenmikroskop) bei nur geringem Vakuum gearbeitet werden kann und so die Beobachtung von empfindlichen Präparaten (wie auch z.B. lebenden Zellen) ermöglicht wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Ziele der Arbeit:

Bakterien und DNA-Viren werden anhand unmethylierter CpG-Motive innerhalb ihrer DNA von den TLR 9 tragenden PDCs und den B-Zellen des humanen Immunsystems als Gefahrensignale erkannt. Mittels synthetischer, CpG-enthaltender ODN nutzt man diese Grundsatzmechanismen, um vergleichbare Immunantworten auszulösen. Auf Grundlage eines unterschiedlichen immunologischen Aktivierungsprofils wurden bislang drei CpG-Klassen definiert: CpG-A, -B und -C. Mit Hilfe von CpG-A war es erstmals möglich, IFN- α in PDCs (den endogenen Hauptproduzenten dieses Zytokins) in Mengen zu induzieren, wie es bislang nur mit Viren selbst möglich war. Auch CpG-C stimuliert PDCs zur Sekretion von IFN- α und aktiviert darüber hinaus B-Zellen - eine Eigenschaft, die CpG-A nicht besitzt. Die sequenzspezifischen und strukturellen Voraussetzungen für diese differenziellen Wirkprofile waren bislang unzureichend verstanden, auch weil die Struktur-Analysen nur begrenzt auf die tatsächlichen Vorgänge im physiologischen Milieu übertragbar waren. Um CpG-ODN für die therapeutische Anwendung zu optimieren, sind die genauen Kenntnisse der Struktur-Wirkungsbeziehungen jedoch unverzichtbar. Ein zweiter Ansatzpunkt zur Optimierung der Anwendung liegt in der Verbesserung der systemischen Stabilität von CpG-ODN. Die Bindung von CpG-ODN an partikuläre Trägersysteme (z.B. Gelatine-Nanopartikel) wurde bereits in unserer Abteilung als mögliches *drug-delivery*-System etabliert. Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips wären partikuläre Strukturen, die aus immunstimulatorischen Nukleinsäuren aufgebaut keiner weiteren Trägermaterialien bedürfen. Beide Ansatzpunkte führen zu den Zielen dieser Arbeit:

- 1) Die Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der CpG-Klassen A und C durch Etablierung geeigneter Methoden zur Untersuchung im physiologischen Milieu.
- 2) Die Entwicklung immunstimulatorischer partikulärer Strukturen auf Basis der in Teil 1) identifizierten wirksamen Strukturelemente beider CpG-Klassen.

Ergebnisse:

- 1) Struktur-Wirkungsbeziehungen von ODN 2216 (CpG-A) und ODN M362 (CpG-C):
 - CpG-A bildet im physiologischen Milieu spontan multimolekulare Strukturen, deren mittlere Durchmesser mit 24-40 nm im Größenbereich von Viren liegen. Es zeigte

sich, dass für diese Multimerisierungen das Zusammenspiel aus flankierenden Poly-G-Motiven, palindromischem Zentrum und eingelagerten Natrium- oder Kaliumionen entscheidend ist. Physiologisches Milieu wirkt sich sowohl den Umgebungs-pH und die Na^+/K^+ -Konzentrationen als auch die Temperatur (37°C) betreffend optimal förderlich auf die Strukturbildung aus. Die Identifizierung dieser maßgeblichen Faktoren machte es möglich, den Strukturaufbau von CpG-A experimentell zu kontrollieren und die immunologischen Wirkungen der verschiedenen Strukturen direkt zu vergleichen. Für die rasche und hohe Induktion von IFN- α und anderen inflammatorischen Zytokinen durch PDCs sind große Partikel verantwortlich. Die Multimerisierungen von ODN 2216 werden bei $\text{pH} < 6$ zunehmend aufgehoben. Unterbindet man die Multimerisierungen durch Präinkubation der ODN bei Temperaturen $> 60^\circ\text{C}$ oder durch Entzug der stabilisierenden Natriumionen (indem man sie zuvor in Aqua ad inj. löst), so verliert ODN 2216 seine immunstimulatorische Aktivität in Bezug auf PDCs. Die schwache Wirkung der CpG-A-Monomere kann jedoch durch Präinkubation von PDCs mit IFN- β deutlich gesteigert werden. Im Gegensatz zu den ebenfalls einzelsträngig vorliegenden ODN 2006 (CpG-B) haben auch Monomere von ODN 2216 keine aktivierende Wirkung auf B-Zellen.

- CpG-C hat durch die palindromische Sequenz theoretisch die Möglichkeit, Hairpins und Duplices zu bilden. ODN M362 zeigt jedoch keine Hairpinstrukturen. Die Duplexformationen sind bei 37°C *in vitro* nicht darstellbar und spielen keine Rolle bei der durch diese ODN initiierten B-Zell-Aktivierung. Duplices haben jedoch Anteil an der Induktion von IFN- α in PDCs.
- Die in dieser Arbeit etablierten Protokolle der Temperatur-Präinkubation ermöglichen erstmalig eine experimentelle Kontrolle der Strukturbildungen von CpG-A und CpG-C und dadurch den Vergleich von Struktur und Wirkung. Das Standardprotokoll für Gelelektrophorese wurde dahingehend modifiziert, dass ein physiologisches Milieu sowohl durch die anwesenden Ionen als auch durch die Umgebungstemperatur (37°C) simuliert werden konnte.

2) Design Nukleinsäure-basierter Nanopartikel:

Zentrale Elemente von CpG-A und CpG-C (palindromische Sequenz, gerüstartige Verbindung mehrerer Nukleinsäuren) wurden eingesetzt, indem ODN M362-Sequenzen (CpG-C) an bi- und trivalenten Linkern für den Strukturaufbau optimiert wurden. Trivalente Linker ermöglichen die variierende Zusammenlagerung der palindromischen Nukleinsäuren in drei Richtungen des Raumes und dadurch die

Bildung großer Partikel. Diese sind den bisher bekannten Maximalstimuli CpG-B und CpG-C hinsichtlich der Aktivierung von B-Zellen gleichwertig und nach Transfektion in B-Zellen deutlich überlegen. Kurze, nicht-palindromische CpG-DNA-Sequenzen an trivalenten Linkern induzieren nach Transfektion deutlich mehr IFN- α in PBMCs als CpG-A, obwohl sie nicht multimerisieren. Wird die (palindromische) RNA-Sequenz von CpG-C in einem trivalenten Linker verwendet, so können ebenfalls große Strukturen generiert werden, die nach Transfektion vergleichbare Mengen IFN- α in PBMCs induzieren wie CpG-A.

Ausblick:

Die vorliegende Dissertation verbindet Fragestellungen der Immunologie und der pharmazeutischen Technologie mit den Möglichkeiten der Biochemie. Es werden nicht nur verschiedene Methoden zur strukturellen Untersuchung von CpG-ODN im physiologischen Milieu etabliert, sondern auch die experimentelle Kontrolle der Strukturbildung von CpG-A ermöglicht. Die entwickelte Technik der Generierung dreidimensionaler, über palindromische Nukleinsäuren aufgebauter Partikel ist nicht auf CpG-Motive in DNA begrenzt, sondern kann auf eine andere für Viren charakteristische Nukleinsäure (Einzelstrang-RNA) übertragen werden. Dadurch würde zusätzlich möglich, die immunologischen Profile von ssRNA, dsRNA und CpG in einem Partikel zu kombinieren und die Art der Immunantwort je nach Zusammensetzung der Partikel gezielt zu bestimmen.

Die klinische Relevanz dieser Arbeit ergibt sich aus den neuen Erkenntnissen über die Multimerisierungen von CpG-A, welche dessen therapeutischen Einsatz optimieren und besser standardisierbar machen sollen. Außerdem werden neue Hinweise auf die unterschiedlichen Aufnahme- und Erkennungsmechanismen beider CpG-Klassen und deren Aktivierung der Synthese von IFN- α gewonnen. Darüber hinaus wurde durch die Entwicklung der Polyvalenten Linker eine grundsätzlich neue Technik im Stil eines Baukastensystems etabliert, welche als Grundstein einer neuen Generation von immunstimulatorischen Multimeren dienen soll. Die Koadministration von Adjuvans und Antigen in direkter räumlicher Nähe bietet neue Gestaltungsmöglichkeiten in der Vakzineentwicklung. Zudem ist zu erwarten, dass unter Einbeziehung der RNA-basierten immunologischen Wirkprofile innerhalb eines Partikels der Einsatz von CpG-ODN zur Therapie von Virusinfektionen und Tumoren weiter verbessert werden kann.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Agrawal, S., Iadarola, P. L., Temsamani, J., Zhao, Q. und Shaw, D. R.: Effect of G-rich sequences on the synthesis, purification, cell uptake, and hemolytic activity of oligonucleotides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1996; 6 (18): 2219-2224
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. und Flavell, R. A.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-8
- Ashkar, A. A., Bauer, S., Mitchell, W. J., Vieira, J. und Rosenthal, K. L.: Local delivery of CpG oligodeoxynucleotides induces rapid changes in the genital mucosa and inhibits replication, but not entry, of herpes simplex virus type 2. *J Virol* 2003; 77: 8948-56,
- Ballas, Z., Rasmussen, W. und Krieg, A.: Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157: 1840-1845
- Banchereau, J. und Steinman, R. M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52,
- Barrat, F. J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J. H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O. und Coffman, R. L.: Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005; 202: 1131-9
- Barton, G. M. und Medzhitov, R.: Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; 300: 1524-5,
- Bartz, H., Mendoza, Y., Gebker, M., Fischborn, T., Heeg, K. und Dalpke, A.: Polyguanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes. *Vaccine* 2004; 23: 148-55,
- Basu, S. und Wickstrom, E.: Temperature and salt dependence of higher order structure formation by antisense c-myc and c-myb phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides containing tetraguanylate tracts. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1327-32
- Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H. und Lipford, G. B.: Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 2001a; 166: 5000-7
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. und Lipford, G.B.: Human TLR 9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001b; 24: 24
- Bekeredjian-Ding, I. B., Wagner, M., Hornung, V., Giese, T., Schnurr, M., Endres, S. und Hartmann, G.: Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol* 2005; 174: 4043-50
- Biron, C. A.: Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 374-81
- Biron, C. A.: Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 2001; 14: 661-4, 2001
- Bogdan, C.: The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 2001; 12: 419-24
- Brazolot Millan, C. L., Weeratna, R., Krieg, A. M., Siegrist, C. A. und Davis, H. L.: CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15553-8

- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H. A., Krieg, A. M., Hartmann, G. und Endres, S.: Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 2000; 165: 6278-86
- Carpentier, A., Laigle-Donadey, F., Zohar, S., Capelle, L., Behin, A., Tibi, A., Martin-Duverneuil, N., Sanson, M., Lacomblez, L., Taillibert, S., Puybasset, L., Van Effenterre, R., Delattre, J. Y. und Carpentier, A. F.: Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncol* 2006; 8: 60-6
- Carpentier, A. F., Chen, L., Maltonti, F. und Delattre, J. Y.: Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 1999; 59: 5429-32
- Carpentier, A. F., Xie, J., Mokhtari, K. und Delattre, J. Y.: Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2469-73
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. und Colonna, M.: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5: 919-23
- Chelvarajan, R. L., Raithatha, R., Venkataraman, C., Kaul, R., Han, S. S., Robertson, D. A. und Bondada, S.: CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2808-18
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. und Harding, C. V.: CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997; 186: 1623-31
- Coley, W. B.: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 3-11
- Cong, Y. P., Song, S. S., Bhagat, L., Pandey, R. K., Yu, D., Kandimalla, E. R. und Agrawal, S.: Self-stabilized CpG DNAs optimally activate human B cells and plasmacytoid dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 1133-9
- Dalpke, A. H., Zimmermann, S., Albrecht, I. und Heeg, K.: Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology* 2002; 106: 102-12
- Davis, H. L., Weeratna, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J. und Krieg, A. M.: CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998; 160: 870-6
- DeRouchey, J., Netz, R. R. und Radler, J. O.: Structural investigations of DNA-polycation complexes. *Eur Phys J E Soft Matter* 2005; 16: 17-28
- Diwan, M., Tafaghodi, M. und Samuel, J.: Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. *J Control Release* 2002; 85: 247-62
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W. und Schmitz, J.: BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000; 165: 6037-46
- Eastcott, J. W., Holmberg, C. J., Dewhirst, F. E., Esch, T. R., Smith, D. J. und Taubman, M. A.: Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid. *Vaccine* 2001; 19: 1636-42
- Elkins, K. L., Rhinehart-Jones, T. R., Stibitz, S., Conover, J. S. und Klinman, D. M.: Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 1999; 162: 2291-8

- Farrar, M. A. and Schreiber, R. D.: The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 571-611
- Fuchs, S. M. and Raines, R. T.: Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry* 2004; 43: 2438-44
- Gilkeson, G. S., Pippen, A. M. und Pisetsky, D. S.: Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest* 1995; 95: 1398-402
- Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. und Singh, R. M.: Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 1966; 5: 467-77
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. und Liu, Y. J.: The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185: 1101-11
- Gursel, M., Verthelyi, D., Gursel, I., Ishii, K. J. und Klinman, D. M.: Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 813-20
- Halperin, S. A., Van Nest, G., Smith, B., Abtahi, S., Whiley, H. und Eiden, J. J.: A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* 2003; 21: 2461-7
- Hartmann, B., Bertrand, H. und Fermandjian, S.: Sequence effects on energetic and structural properties of phosphorothioate DNA: a molecular modelling study. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 3342-7
- Hartmann, G. and Krieg, A. M.: Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164: 944-53
- Hartmann, G., Battiany, J., Poeck, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S. und Endres, S.: Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1633-41
- Hata, N., Sato, M., Takaoka, A., Asagiri, M., Tanaka, N. und Taniguchi, T.: Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 518-25
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. und Aderem, A.: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-103
- Heckelsmiller, K., Beck, S., Rall, K., Sipos, B., Schlamp, A., Tuma, E., Rothenfusser, S., Endres, S. und Hartmann, G.: Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002a; 32: 3235-45
- Heckelsmiller, K., Rall, K., Beck, S., Schlamp, A., Seiderer, J., Jahrsdorfer, B., Krug, A., Rothenfusser, S., Endres, S. und Hartmann, G.: Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* 2002b; 169: 3892-9
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. und Bauer, S.: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-9
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. und Akira, S.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-5
- Horner, A. A. and Raz, E.: Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide-based vaccination and immunomodulation: two unique but complementary strategies for the treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 706-12
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. und Hartmann, G.: Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168: 4531-7

- Hornung, V., Schlender, J., Guenther-Biller, M., Rothenfusser, S., Endres, S., Conzelmann, K.K. und Hartmann, G.: Replication-dependent potent IFN- α induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol* 2004; 173: 5935-43
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S. und Hartmann, G.: Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11: 263-70
- Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. und Yamamoto, S.: Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN- γ production in vitro. *J Immunol* 1999; 163: 3642-52
- Isaacs, A. and Lindenmann, J.: Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 1987; 7: 429-38
- Ishii, K.J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O. und Akira, S.: A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 2006; 7: 40-8
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K. und Fukuhara, S.: Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* 2001; 166:2961-9
- Kadowaki, N. und Liu, Y. J.: Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2002; 63: 1126-32
- Kandimalla, E. R., Bhagat, L., Yu, D., Cong, Y., Tang, J. und Agrawal, S.: Conjugation of ligands at the 5'-end of CpG DNA affects immunostimulatory activity. *Bioconjug Chem* 2002; 13: 966-74
- Kaplan, I. M., Wadia, J. S. und Dowdy, S. F.: Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release* 2005; 102: 247-53
- Katze, M. G., He, Y. und Gale, M., Jr.: Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 675-87
- Kerkmann, M., Costa, L. T., Richter, C., Rothenfusser, S., Battiany, J., Hornung, V., Johnson, J., Englert, S., Ketterer, T., Heckl, W., Thalhammer, S., Endres, S. und Hartmann, G.: Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon- α induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 8086-93
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S. und Hartmann, G.: Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170: 4465-74
- Klinman, D. M., Conover, J. und Coban, C.: Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun* 1999; 67: 5658-63
- Klinman, D. M., Ishii, K. J., Gursel, M., Gursel, I., Takeshita, S. und Takeshita, F.: Immunotherapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Drug News Perspect* 2000a; 13: 289-96
- Klinman, D. M., Kamstrup, S., Verthelyi, D., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, F. und Gursel, M.: Activation of the innate immune system by CpG oligodeoxynucleotides: immunoprotective activity and safety. *Springer Semin Immunopathol* 2000b; 22: 173-83
- Klinman, D. M., Takeno, M., Ichino, M., Gu, M., Yamshchikov, G., Mor, G. und Conover, J.: DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 19: 245-56
- Klinman, D. M., Xie, H., Little, S. F., Currie, D. und Ivins, B. E.: CpG oligonucleotides improve the protective immune response induced by the anthrax vaccination of rhesus macaques. *Vaccine* 2004; 22: 2881-6

- Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. und Krieg, A. M.: CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2879-83
- Kohrgruber, N., Halanek, N., Groger, M., Winter, D., Rappersberger, K., Schmitt-Egenolf, M., Stingl, G. und Maurer, D.: Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol* 1999; 163: 3250-9
- Krieg, A. M.: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-60
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. und Klinman, D. M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-9
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Schorr, J. und Davis, H. L.: The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol* 1998; 6: 23-7
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M. und Hartmann, G.: Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α /beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2154-63
- Kuramoto, E., Yano, O., Kimura, Y., Baba, M., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T. und Tokunaga, T.: Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1128-31
- Lanzavecchia, A.: Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 773-93, 1990
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T. und Golenbock, D. T.: TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190-8, 2004
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F. und Tough, D. F.: Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; 14: 461-70
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A.: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996; 86: 973-83
- Lennert, K. und Remmele, W.: [Measurement of the cell nucleus in the lymph node cells of man. II.Reticulum cells and endothelial cells.]. *Acta Haematol* 1958; 20: 301-17
- Lillo, F., Basile, S. und Mantegna, R. N.: Comparative genomics study of inverted repeats in bacteria. *Bioinformatics* 2002; 18: 971-9
- Lipford, G. B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H. und Heeg, K.: CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2340-4
- Lipford, G. B., Bendigs, S., Heeg, K. und Wagner, H.: Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines. *Immunology* 2000; 101: 46-52
- Liu, Q. und Sommer, S. S.: The SSCP phenomenon: addition of HEPES buffer dramatically affects electrophoretic mobility. *Biotechniques* 1998; 25: 50-2
- Liu, Y. J.: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 275-306
- Liu, Y. J., Johnson, G. D., Gordon, J. und MacLennan, I. C.: Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today* 1992; 13: 17-21
- Marrack, P., Kappler, J. und Mitchell, T.: Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999; 189: 521-30

- Marshall, J. D., Fearon, K., Abbate, C., Subramanian, S., Yee, P., Gregorio, J., Coffman, R. L. und Van Nest, G.: Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 781-92
- Marshall, J. D., Fearon, K. L., Higgins, D., Hessel, E. M., Kanzler, H., Abbate, C., Yee, P., Gregorio, J., Cruz, T. D., Lizcano, J. O., Zolotarev, A., McClure, H. M., Brasky, K. M., Murthy, K. K., Coffman, R. L. und Nest, G. V.: Superior activity of the type C class of ISS in vitro and in vivo across multiple species. *DNA Cell Biol* 2005; 24: 63-72
- Maruyama, M., Lam, K. P. und Rajewsky, K.: Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 2000; 407: 636-42
- McCluskie, M. J. and Davis, H. L.: CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol* 1998; 161: 4463-6
- McHeyzer-Williams, M. G. and Ahmed, R.: B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 172-9
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C. A., Jr.: A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-7
- Messina, J. P., Gilkeson, G. S. und Pisetsky, D. S.: Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 1991; 147: 1759-64
- Messina, J. P., Gilkeson, G. S. und Pisetsky, D. S.: The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens. *Cell Immunol* 1993; 147: 148-57
- Moldoveanu, Z., Love-Homan, L., Huang, W. Q. und Krieg, A. M.: CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* 1998; 16: 1216-24
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. und Kupfer, A.: Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998; 395: 82-6
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. und Aguet, M.: Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994; 264: 1918-21
- Nauts, H. C. und McLaren, J. R.: Coley toxins--the first century. *Adv Exp Med Biol* 1990; 267: 483-500
- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N. und Steinman, R. M.: Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82: 487-93
- Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J. und Lund-Johansen, F.: Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12551-6
- Ortaldo, J. R., Mantovani, A., Hobbs, D., Rubinstein, M., Pestka, S. und Herberman, R. B.: Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 1983; 31: 285-9
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. und Aderem, A.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766-71
- Pestka, S.: The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers* 2000; 55: 254-87
- Phan, A. T. und Mergny, J. L.: Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 4618-25
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. und Beutler, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-8

- Redford, T. W., Yi, A. K., Ward, C. T. und Krieg, A. M.: Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1998; 161: 3930-5
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R. und Liu, Y. J.: Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283: 1183-6
- Roberts, T. L., Sweet, M. J., Hume, D. A. und Stacey, K. J.: Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. *J Immunol* 2005; 174: 605-8
- Rothenfusser, S., Hornung, V., Ayyoub, M., Britsch, S., Towarowski, A., Krug, A., Sarris, A., Lubenow, N., Speiser, D., Endres, S. und Hartmann, G.: CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro. *Blood* 2004; 103: 2162-9
- Rothenfusser, S., Hornung, V., Krug, A., Towarowski, A., Krieg, A. M., Endres, S. und Hartmann, G.: Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/beta. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3525-34
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G. B., Wagner, H. und Bauer, S.: Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2541-50
- Sen, D. und Gilbert, W.: A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature* 1990; 344: 410-4
- Sen, D. und Gilbert, W.: Guanine quartet structures. *Methods Enzymol* 1992; 211: 191-9
- Shipman, C., Jr.: Evaluation of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as a tissue culture buffer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 130: 305-10
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. und Liu, Y. J.: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-7
- Stetson, D.B. und Medzhitov, R.: Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 2006; 24: 93-103
- Sun, S., Cai, Z., Langlade-Demoyen, P., Kosaka, H., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A. und Sprent, J.: Dual function of Drosophila cells as APCs for naive CD8+ T cells: implications for tumor immunotherapy. *Immunity* 1996; 4: 555-64
- Svensson, H., Johannisson, A., Nikkila, T., Alm, G. V. und Cederblad, B.: The cell surface phenotype of human natural interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry. *Scand J Immunol* 1996; 44: 164-72, 1996
- Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S.: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. und Akira, S.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999a; 11: 443-51
- Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Takeda, K. und Akira, S.: TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999b; 231: 59-65
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T. et al.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 955-62
- Tokunaga, T., Yamamoto, S. und Namba, K.: A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79: 682-6
- Underhill, D. M.: Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1767-75

- Vereb, G., Matko, J., Vamosi, G., Ibrahim, S. M., Magyar, E., Varga, S., Szollosi, J., Jenei, A., Gaspar, R., Jr., Waldmann, T. A. und Damjanovich, S.: Cholesterol-dependent clustering of IL-2R α and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6013-8
- Visintin, A., Latz, E., Monks, B. G., Espevik, T. und Golenbock, D. T.: Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* 2003; 278: 48313-20
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H. L. und Krieg, A. M.: Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004; 34: 251-62
- Walker, P. S., Scharton-Kersten, T., Krieg, A. M., Love-Homan, L., Rowton, E. D., Udey, M. C. und Vogel, J. C.: Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN- γ -dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6970-5
- Wiemann, B. und Starnes, C. O.: Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994; 64: 529-64
- Wooldridge, J. E., Ballas, Z., Krieg, A. M. und Weiner, G. J.: Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 1997; 89: 2994-8
- Wu, C. C. N., Lee, J., Raz, E., Corr, M. und Carson, D. A.: Necessity of oligonucleotide aggregation for toll-like receptor 9 activation. *J. Biol. Chem* 2004; 279(32):33071-8
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O. und Tokunaga, T.: Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* 1992a; 148: 4072-6
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Shimada, S., Kuramoto, E., Yano, O., Kataoka, T. und Tokunaga, T.: DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 1992b; 36: 983-97,
- Yi, A. K., Chang, M., Peckham, D. W., Krieg, A. M. und Ashman, R. F.: CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol* 1998; 160: 5898-906, 1998
- Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S. und Krieg, A. M.: Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol* 1996; 157: 5394-402
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. und Fujita, T.: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 730-7
- Yu, D., Kandimalla, E. R., Bhagat, L., Tang, J. Y., Cong, Y., Tang, J. und Agrawal, S.: 'Immunomers'--novel 3'-3'-linked CpG oligodeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 4460-9
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F. und Sprent, J.: Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8 $^{+}$ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8: 591-9
- Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G. B., Rocken, M., Wagner, H. und Heeg, K.: CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 160: 3627-30

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AP-1	Adapterprotein-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Aqua ad inj.	Wasser für Injektionszwecke
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCR	B-Zellrezeptor
BDCA	<i>blood dendritic cell antigen</i>
BrdU	<i>5-bromo-2'-desoxyuridine</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Zelloberflächenantigene)
CG	Cytidin-Guanosin
CpG	Cytidin-(phosphat)-Guanosin-Dinukleotid
D	Polydispersität
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang, doppelsträngig
eIF2 α	<i>eucaryotic initiation factor 2α</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESEM	<i>Environmental Scanning Electron Microscope</i> (Prozessrasterelektronenmikroskop)
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HEV	<i>high endothelial venules</i> , postkapilläre Venolen
HLADR	<i>human leukocyte antigen DR</i>
HSA	Humanes Serum-Albumin
I κ B α	<i>Inhibitor of NF-κBα</i>
IKK	<i>inhibitory κB kinase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IPC	<i>interferon producing cell</i> , Interferon-produzierende Zelle
IRAK 1/ 4	IL-1R-assozierte Kinase 1/4
IRF 3/7	<i>IFN regulatory factor 3/7</i>
isRNA	immunstimulatorische RNA
IS	interstitiell
IZ	intrazellulär
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	<i>leucine rich repeats</i>
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)

mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxynukleotide
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	<i>Pattern-recognition-receptor</i>
PTD	<i>Protein Transduction Domain</i>
PTO	Phosphorothioat
PVL	Polyvalente Linker
R	Arginin
rLU/min	<i>relative light units per minute</i> (BrdU-Assay)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SC-R	Scavenger Rezeptor
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	Einzelstrang, einzelsträngig
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBK1	<i>TANK-binding-kinase-1</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
T _H	T-Helfer
TIR	Toll/ IL-1Rezeptor
TIRAP	<i>TIR domain containing adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAF 6	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
TRAM	<i>TRIF related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-β</i>

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

➤ Originalarbeiten:

2005:

Kerkmann M., Costa LT., **Richter C.**, Rothenfusser S., Battiany J., Hornung V., Johnson J., Englert S., Ketterer T., Heckl W., Thalhammer S., Endres S., Hartmann G.:
Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high IFN- α induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells
Journal of Biological Chemistry 2005; 280:8086-8093

2006:

Richter C., Bekeradjian-Ding I., Kaesmayr D., Besch R., Endres S. und Hartmann G.:
Controlling nanoparticle formation by CpG-A oligonucleotides
In Vorbereitung

➤ Vorträge:

Richter C.: CpG-Oligonucleotide G-tetrad formation mimics infectivity of viral particles
Symposium Gentianum, Wildbad Kreuth, D, 14.-15.01.2005

➤ Posterpräsentationen:

Richter C., Bekeradjian-Ding I., Kaesmayr D., Besch R., Endres S. und Hartmann G.:
Controlling nanoparticle formation by CpG-A Oligonucleotides
1st Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, New York, USA, 15.-18.09.2005

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Gunther Hartmann für die vertrauensvolle, fachliche und persönliche Unterstützung sowie die Gewährung großer wissenschaftlicher Freiräume. Es war eine tolle Erfahrung für mich, meine Ergebnisse auf Kongressen und in wissenschaftlichen Zeitschriften präsentieren zu dürfen. Mit seiner Erlaubnis, in der ‚verbleibenden Freizeit‘ ein betriebswirtschaftliches Aufbaustudium abzuschließen, hat er meine beruflichen Ambitionen anerkennend gefördert.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Endres für sein enormes persönliches Engagement für jeden Einzelnen seiner Mitarbeiter. Seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft und wohlwollende Unterstützung haben mich von Anfang an beeindruckt und begleitet.

Für die Einführung in experimentelles Arbeiten im Labor, die unermüdliche Hilfe, die hervorragende Zusammenarbeit und - dass ihr einfach im richtigen Moment ‚da‘ wart - danke ich Frau Dr. Isabelle Bekerredjian-Ding (Mikrobiologie, Universität Heidelberg) und Herrn Dr. Robert Besch (Dermatologische Klinik, LMU).

Ich danke Dipl. Chem. Daniel Käsmayr für seinen Rat und seine Diskussionsbereitschaft in sämtlichen chemischen Fragestellungen.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung, besonders Meike Schäfer (Schatzi, was würde ich ohne Dich machen!), Dr. Veit Hornung, Rosemarie Kiefl, Susanne Wenk und Andrea Mühlberger, sei für die freundschaftlich-kollegiale Zusammenarbeit und die immer vorhandene Hilfsbereitschaft gedankt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Klaus Degitz (Dermatologische Klinik, LMU) für die Möglichkeit, in seinem Labor die Gelelektrophoresen durchzuführen. Mein Dank gilt ebenfalls PD Dr. Carsten Rudolph (Kinderklinik, LMU) für die Möglichkeit, in seinem Labor die Zetapotenzialmessungen durchzuführen. Meinem Kooperationspartner Prof. Dr. Ivan Rosenberg (*Academy of Sciences*, Prag, CZ) sei herzlich gedankt.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Susanne Richter-Weidenbusch und Dr. rer. nat. Wolfgang Richter, von Herzen bedanken – sie begleiten mein Leben mit großer Liebe und sind mir gleichermaßen Freunde und Vorbilder. Joe, ich bin sehr stolz auf dich!

Lebenslauf

Christine Richter

geboren am 17. Januar 1977 in Haan (Nordrhein-Westfalen)

Schulische Ausbildung

1983 – 1987	Grundschule Klauberg, Solingen
1987 – 1996	Gymnasium Schwertstraße, Solingen
1996	Abitur (Note: 1,8)

Akademische Ausbildung und Berufserfahrung

1996 – 2001	Studium der Pharmazie , Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
1998	1. Staatsexamen
2001	2. Staatsexamen
2002-2003	Praktisches Jahr, München
	1. Halbjahr: Löwen Apotheke
	2. Halbjahr: Internationale Ludwigsapotheke
2003	3. Staatsexamen (Gesamtnote: 2,0)
2003	Approbation zur Apothekerin
2003 - 2005	Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München Klinisch-Pharmakologische Konsiliartätigkeit
2003 – 2005	Wirtschaftsakademie deutscher Apotheker/ Universität Bayreuth Aufbaustudiengang: Praktische Betriebswirtin für die Pharmazie (Gesamtnote: 1,7)
2006 – 2007	Rechts- und Wirtschaftswissenschaftliche Fakultät, Universität Bayreuth Master of Business Administration (Health Care Management)

Promotion

Seit 08/2003	Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der LMU, München Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie Leiter: Prof. Dr. Endres Arbeitsgruppe ‚Therapeutische CpG-Oligonukleotide‘ Leiter: Prof. Dr. Hartmann
--------------	---

Stipendien

09/2005	Reisestipendium der GlaxoSmithKline Stiftung
11 – 12/2005	Stipendium des DFG-Graduiertenkollegs 1202 ‚Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie‘